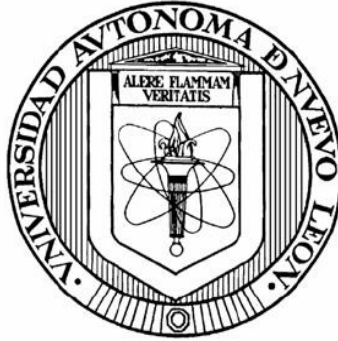


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN EL ADN  
EXTRACELULAR OBTENIDO DE LA CADENA DE PRODUCCIÓN DEL MELÓN  
Y SU CAPACIDAD DE INSERCIÓN EN BACTERIAS**

POR

L.B.G. ANDREA HUERTA ESCOBEDO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
MICROBIOLOGÍA

Noviembre, 2020

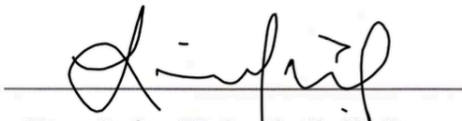
**PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A  
ANTIBIÓTICOS EN EL ADN EXTRACELULAR OBTENIDO  
DE LA CADENA DE PRODUCCIÓN DEL MELÓN Y SU  
CAPACIDAD DE INSERCIÓN EN BACTERIAS**

**Comité de Tesis**



Dra. Norma Laura Heredia Rojas

**Presidente**



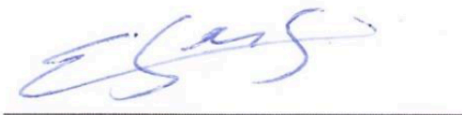
Dra. Luisa Yolanda Solís Soto

**Secretario**



Dr. José Santos García Alvarado

**Vocal**



Dr. Eduardo Franco Frias

**Vocal**



Dr. José Ángel Merino Mascorro

**Vocal**

**PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A  
ANTIBIÓTICOS EN EL ADN EXTRACELULAR OBTENIDO  
DE LA CADENA DE PRODUCCIÓN DEL MELÓN Y SU  
CAPACIDAD DE INSERCIÓN EN BACTERIAS**

**Dirección de Tesis**

A handwritten signature in blue ink, reading "Norma Laura Heredia", is written over a horizontal line.

Dra. Norma Laura Heredia Rojas

**Director de Tesis**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas, del Departamento de Microbiología de la U.A.N.L. bajo la dirección de la Dra. Norma Heredia. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (Proyecto A1-S-25033).

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por haberme brindado una beca durante dos años que me permitió iniciar y concluir satisfactoriamente mis estudios de maestría (CVU: 923973).

A la **Dra. Norma Laura Heredia Rojas**, por abrirme las puertas y permitirme tener un lugar dentro del Laboratorio de Bioquímica y Genética de los Microorganismos (LABGEM), asignarme un área de estudio que me apasionó, dirigir esta tesis y darle correcciones. Agradezco su increíble apoyo incluso después de terminar la maestría para que continuara con mi carrera profesional.

Al **Dr. José Santos García Alvarado**, por las observaciones hechas a la tesis y guía en seminarios realizados, que me han dejado mucha enseñanza.

A la **Dra. Luisa Yolanda Solís Soto**, por la revisión hecha a esta tesis, además de los consejos para terminar mi trabajo de experimentación.

Al **Dr. Eduardo Franco Frias**, por el apoyo durante mi trabajo en biología molecular, sus consejos que llevaron a la realización de la tesis y su correcciones en la misma.

Al **Dr. José Ángel Merino Mascorro**, por las correcciones a esta tesis y su apoyo para terminarla con éxito.

A la **M.C. Yaraymi Ortiz** por todo el apoyo que me ha brindado y que me ha formado como mejor alumna, investigadora y persona.

A todos mis **compañeros del LABGEM**, que de un modo u otro han apoyado a la realización de este trabajo.

## DEDICATORIA

*A **Dios**, por nunca dejarme sola. A él le agradezco tantas cosas buenas que me dio durante estos dos años de maestría, llenos de milagros, bendiciones y aprendizaje. Por haberme dado la fortaleza para seguir adelante en aquellos momentos de debilidad.*

*A mis **padres**, sin su apoyo incondicional desde que inicié mis estudios, yo no hubiera llegado a donde estoy, no sería ni la mitad de persona que soy ni podría seguir avanzando. Todo lo que hago es para hacerlos sentir orgullosos de la hija que tienen. Gracias por tenerme paciencia, verme caer y crecer. Gracias por todo el tiempo, esfuerzo, cansancio, que invirtieron en mí. Todavía no termino de pagarles todo. Este trabajo y título también son suyos.*

*A mis **abuelos**, que forman una parte vital en mi vida, les agradezco tantas cosas que me han dado. Dios los cuide y me permita tenerlos acompañándome en cada logro.*

*A la **Dra. Norma**, quien es un gran ejemplo a seguir para mí, como persona, mujer y profesionalista, espero algún día tener tantos logros como usted. Gracias por el apoyo dentro y fuera del laboratorio.*

*A mis mejores amigos **José, Jorge y Willy**, otro logro más que tengo la fortuna de compartir con ustedes. Gracias por todo el apoyo, por nunca dejarme sola cuando tengo un problema, me enseñan mucho cada día. No se imaginan cuánto los quiero, son mi familia y espero lo sigamos siendo por muchos años más.*

*A mi mejor amiga **Jessica**, gracias por tanto. Sin tu apoyo no habría hecho muchas de las cosas que hice hasta ahora, equivocarme y acertar siempre contigo apoyándome. Gracias por estar para mí aún y con las preguntas e ideas más tontas, por ponerme los pies en la tierra cuando lo necesito y darme ese empujón cuando tengo miedo al cambio. Eres la hermana que nunca tuve y lo sabes. Te quiero y estoy para ti de igual manera.*

*A mis amigos del LABGEM, **Axel, Zaira, Yara**, encontré en ustedes personas en las cuales puedo contar tanto profesional como personalmente. Espero poder seguirlos viendo crecer, gracias por el apoyo que me brindaron estos dos años, risas y consejos.*

*A mis amigos de UIMO, que me siguieron abriendo las puertas de mi antiguo laboratorio, **Doc Manuel, Aldo, Alonso, Alondra**. Gracias por seguir apoyándome aunque no esté con ustedes y por los consejos. Siempre me hicieron sentir que nunca deje el lab. ¡Buen camino!*

# ÍNDICE

## ÍNDICE DE TABLAS

## ÍNDICE DE FIGURAS

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

## RESUMEN

## ABSTRACT

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>2.1 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAs)</b>	<b>3</b>
<b>2.2 PATÓGENOS BACTERIANOS ASOCIADOS A LAS ETAs</b>	<b>4</b>
<b>2.3 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y SU IMPORTANCIA EN LA INOCUIDAD ALIMENTARIA</b>	<b>5</b>
<i>2.3.1 Uso de antibióticos en la agricultura</i>	<i>6</i>
<i>2.3.2 Uso de antibióticos en la ganadería</i>	<i>7</i>
<i>2.3.3 Aparición de la resistencia a antibióticos</i>	<i>8</i>
<i>2.3.4 Rutas de transmisión de GRAs a lo largo de la cadena alimentaria</i>	<i>8</i>
<b>2.4 EL MELÓN COMO FUENTE DE CONTAMINACIÓN POR MICROORGANISMOS</b>	<b>10</b>
<b>2.5 ADN EXTRACELULAR (ADNex)</b>	<b>11</b>
<i>2.5.1 ADNex en ambientes acuáticos</i>	<i>12</i>
<i>2.5.2 ADNex en suelos</i>	<i>13</i>
<i>2.5.3 Liberación de ADNex por bacterias</i>	<i>14</i>
<i>2.5.4 Factores que afectan la estabilidad del ADNex</i>	<i>15</i>
<b>2.6 TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES (THG)</b>	<b>19</b>
<i>2.6.1 Transformación</i>	<i>19</i>
<i>2.6.2 Conjugación</i>	<i>22</i>
<i>2.6.3 Transducción</i>	<i>22</i>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>24</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>25</b>

<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>5.1 OBJETIVO GENERAL</b>	26
<b>5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	26
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
<b>6.1 DIAGRAMA GENERAL DE LOS PROCEDIMIENTOS REALIZADOS</b>	27
<b>6.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS</b>	27
<b>6.3 PROCESAMIENTO Y OBTENCIÓN DE ADNEX</b>	28
<i>6.3.1 Filtración por membrana</i>	28
<i>6.3.2 Extracción de ADN extracelular</i>	28
<b>6.4 DETECCIÓN DE GENES POR PCR PUNTO FINAL</b>	29
<b>6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	31
<b>6.6 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFORMACIÓN</b>	31
<i>6.6.1 Condiciones de crecimiento de Acinetobacter baumannii A118</i>	31
<i>6.6.2 Transformación natural</i>	31
<i>6.6.3 Frecuencia de transformación</i>	32
<i>6.6.4 Confirmación de transformantes</i>	32
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>53</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>54</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Microorganismos asociados a frutas y verduras, patógenos de plantas y humanos encontrados comúnmente.	5
<b>Tabla 2.</b> Antibióticos más comúnmente utilizados en la agricultura, su nombre comercial, blanco y plantas beneficiadas.	7
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento para la detección de genes de resistencia a antibióticos utilizados en este estudio.	29
<b>Tabla 4.</b> Secuencias de oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento para la detección de elementos móviles genéticos utilizados en este estudio.	30
<b>Tabla 5.</b> Número de muestras (%) que poseían genes relacionados a la resistencia a antibióticos evaluados en este estudio.	33
<b>Tabla 6.</b> Número de muestras (%) del ambiente de producción de melón que contenían genes relacionados a elementos móviles evaluados en este estudio.	34
<b>Tabla 7.</b> Análisis obtenido en R para la regresión logística entre presencia de cualquier gen (movilidad y resistencia) y muestras.	40
<b>Tabla 8.</b> Análisis obtenido en R para la regresión logística entre presencia de genes de resistencia a antibióticos y muestras.	41
<b>Tabla 9.</b> Análisis obtenido en R para la regresión logística entre presencia de elementos genéticos móviles y muestras.	41
<b>Tabla 10.</b> Frecuencias de transformación obtenidas de acuerdo al ADN transformante en <i>Acinetobacter baumannii</i> A118.	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modos de transmisión de patógenos entéricos en frutas y vegetales.	4
<b>Figura 2.</b> Maquinaria de toma de ADN libre.	21
<b>Figura 3.</b> Presencia de Genes de Resistencia a Antibióticos en los distintos tipos de muestra.	35
<b>Figura 4.</b> Presencia de Genes de Resistencia a Antibióticos en lavados de melones.	36
<b>Figura 5.</b> Presencia de Genes de Resistencia a Antibióticos en agua de riego.	36
<b>Figura 6.</b> Presencia de Genes de Resistencia a Antibióticos en lavados de manos de pizcadores.	37
<b>Figura 7.</b> Presencia de Elementos Genéticos Móviles en lavados de melones.	38
<b>Figura 8.</b> Presencia de Elementos Genéticos Móviles en agua de riego.	38
<b>Figura 9.</b> Presencia de Elementos Genéticos Móviles en lavados de manos.	39

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNex	Ácido Desoxirribonucleico Extracelular
ETAs	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
OMS	Organización Mundial de la Salud
CMB	Concentración Mínima Bactericida
EUA	Estados Unidos de América
TVG	Transferencia Vertical de Genes
THG	Transferencia Horizontal de Genes
BRAs	Bacterias Resistentes a Antibióticos
GRAs	Genes de Resistencia a Antibióticos
μm	Micrómetros
μl	Microgramos
l	Litros
g	Gramos
pb	Pares de bases
ARN	Ácido ribonucleico
VMEs	Vesículas de Membrana Externa
EGMs	Elementos Genéticos Móviles
kb	Kilobases
ml	Mililitro

μl	Microlitros
GITC	Isotiocianato de Guanidina
M	Molar
mM	Milimolar
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (siglas en inglés)
°C	Grados centígrados
RM	Razón de Momios ( <i>Odds ratio</i> )
PBS	Buffer de fosfato salino
UFC	Unidad Formadora de Colonia

## RESUMEN

Un mecanismo de transferencia horizontal de genes es la transformación bacteriana en donde se utiliza ADN extracelular (ADNex) que se encuentra en el medio, ya sea liberado por bacterias vivas y/o muertas, causando que una bacteria competente que esté preparada para tomar y utilizar este material genético tenga nuevas características. En este intercambio, los microorganismos pueden obtener genes de resistencia a antibióticos de distintos entornos. En el presente trabajo se analizó la presencia de genes extracelulares de resistencia a antibióticos en muestras asociadas al melón, con la finalidad de determinar si *Acinetobacter baumannii*, bacteria naturalmente competente, puede utilizar este material genético para obtener la capacidad de crecimiento en un medio con ampicilina al que era sensible originalmente. Se analizaron 19 genes relacionados a la resistencia a antibióticos (14 de resistencia a antibióticos y 5 de elementos genéticos móviles) en 201 muestras de ADNex originadas de lavados de melones, lavados de manos de pizcadores y agua de riego. Posteriormente se tomaron muestras positivas para *ampC* con el fin de evaluar si este ADNex era capaz de generar resistencia en *A. baumannii*. Como resultados se encontró que el 90.8% de las muestras provenientes de lavado de manos de pizcadores presentaron al menos uno de los grupos de genes analizados, seguido de los lavados de melones con 74% y el agua de riego 61.1%. Los genes con mayor predominancia entre muestras fueron *ampC* (49.8 %, 100/201) del grupo de los  $\beta$ -lactámicos, *tetA* (23.9 %, 48/201) de las tetraciclinas, *ermA* (16 %, 32/201) de la clase de los macrólidos y *sulI* (13.4 %, 27/201) de las sulfonamidas. De entre los elementos móviles analizados, el de mayor porcentaje de muestras positivas fue el gen *intI* (23.9 %, 48/201) perteneciente al grupo de las integrinas. Mediante regresión logística se encontró que existe una asociación significativa entre la presencia de cualquiera de los genes y los lavados de manos ( $p < 0.05$ ), significando que las manos de pizcadores son un importante fuente de contaminación durante la producción de melón, además de ser el ADNex un reservorio valioso de genes de resistencia a antibióticos. Este ADNex fue capaz de transformar naturalmente a la *A. baumannii* utilizando muestras positivas para ampicilina generándole una resistencia que no poseía, con eficiencias de transformación de  $10^{-7}$  para los tres tipos de muestra.

## ABSTRACT

A horizontal gene transfer mechanism is bacterial transformation using extracellular DNA (exADN) found in the medium, either released by living or dead bacteria, causing competent bacteria to be prepared to take and use this genetic material and get new characteristics. In this exchange, microorganisms can obtain antibiotic resistance genes from different environments.

In this work, the presence of extracellular antibiotic resistance genes in samples associated with cantaloupe was analyzed, in order to determine if *Acinetobacter baumannii*, a naturally competent bacteria, can use this genetic material to grow in an ampicillin medium, to which he was originally sensitive. Nineteen genes related to antibiotic resistance (14 of antibiotic resistance and 5 of mobile genetic elements) were analyzed in 201 exDNA samples originating from cantaloupe rinses, farmworkers' hands rinses and irrigation water. Subsequently *ampC*-positive samples were taken in order to assess whether this exDNA was capable of generating resistance in *A. baumannii*. As results, it was found that 90.8% of the samples from the farmworkers' hands rinses presented at least one of the gene groups analyzed, followed by cantaloupe rinses with 74% and irrigation water 61.1%. The genes with the highest predominance between samples were *ampC* (49.8%, 100/201) from the group of  $\beta$ -lactams, *tetA* (23.9%, 48/201) from tetracyclines, *ermA* (16%, 32/201) from the class of the macrolides and *sul1* (13.4%, 27/201) of the sulfonamides. Among the mobile elements analyzed, the one with the highest percentage of positive samples was *intI* (23.9%, 48/201) belonging to the group of integrins. Using logistic regression, it was found that there is a significant association between the presence of any of the genes and hand washes ( $p < 0.05$ ), meaning that farmworkers' hands are an important source of contamination during cantaloupe production, in addition to being DNAex a valuable reservoir of antibiotic resistance genes. This exDNA was able to naturally transform *A. baumannii* using ampicillin-positive samples, generating resistance it didn't possess, with transformation efficiencies of  $10^{-7}$  for the three types of sample.

# 1. INTRODUCCIÓN

Se sabe que las bacterias son capaces de transferir genes entre cepas de la misma y de diferente especie a través de múltiples mecanismos que incluyen, entre otros, la transferencia de plásmidos, la transducción de fagos y la transformación natural. Se conocen numerosos ejemplos de genes de resistencia a antibióticos que se adquieren por bacterias no patógenas y que traen consecuencias para la salud humana como la familia *blaOXA*, *blaCTXM*, *tet*, *erm*, *sul*, entre muchas otras. Como resultado de tal promiscuidad bacteriana, el uso de antibióticos en la agricultura puede facilitar la aparición de genes de resistencia en microorganismos, pudiéndose transferir a patógenos dificultando de esta manera los tratamientos para su eliminación o control. El argumento aquí es que el uso de antibióticos crea un ambiente que propicia y estimula la acumulación y movimiento de genes de resistencia, y es la existencia de este reservorio la que representa una amenaza grave para la salud pública (Chang et al., 2015).

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) son causadas por bacterias que pueden crecer dentro y fuera de la superficie de los productos vegetales y muchos otros. El melón (*Cucumis melo* L.) en particular, es un producto que se encuentra en contacto directo con el suelo y agua por lo que sus vías de contaminación son sencillas y múltiples para que bacterias como *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* causen una colonización. A esto, se le añade que la superficie rugosa del melón representa una zona de fácil adherencia para microorganismos creando una red que les permite permanecer y eventualmente intercambiar información genética (Bowen et al., 2006).

Las bacterias pueden intercambiar material genético mediante tres distintos mecanismos, siendo uno de ellos la transformación bacteriana en la cual, se involucra el ADN extracelular (ADNex) como materia prima para la toma de nuevos genes que pueden conferir a bacterias nuevas características como la resistencia a antibióticos que no tenían antes (Berger et al., 2010).

El ADNex forma parte de otros mecanismos además de la transferencia horizontal. Se ha visto como componente importante de biopelículas y como fuente de nutrientes para las

bacterias. Tanto la transferencia genética como la formación de biopelículas son problemas crecientes en la industria alimentaria que causan que microorganismos inocuos o moderadamente patógenos se puedan convertir en un riesgo serio para humanos causando enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), que debido a sus nuevas características (mayor resistencia a antibióticos) sean difíciles de controlar (Ibáñez de Aldecoa et al., 2017).

La capacidad de las bacterias para tomar ADN del medio en el que se encuentran mediante transformación bacteriana, como la de *Acinetobacter baumannii*, es un mecanismo potencial para la diseminación de genes de resistencia a antibióticos, no solamente en el sector agrícola y en el entorno de producción del melón, sino también en otros como los hospitales y el sector ganadero donde el uso de los antibióticos también es alto (von Wintersdorff et al., 2016).

Por lo tanto, en este trabajo se buscó la presencia de ADN del medio en muestras asociadas a la producción de melón con la finalidad de determinar si existen genes de resistencia a antibióticos en forma de ADN libre que pudieran ser aprovechados por otras bacterias para obtener nuevas características que les confieran una ventaja en el medio en el que están presentes. Además, se trató de determinar si una bacteria que naturalmente tiene la capacidad de obtener ADN del medio como lo es *Acinetobacter baumannii*, puede utilizar estos genes encontrados en las muestras para crecer en medios con antibióticos en los que no podía originalmente.



## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)**

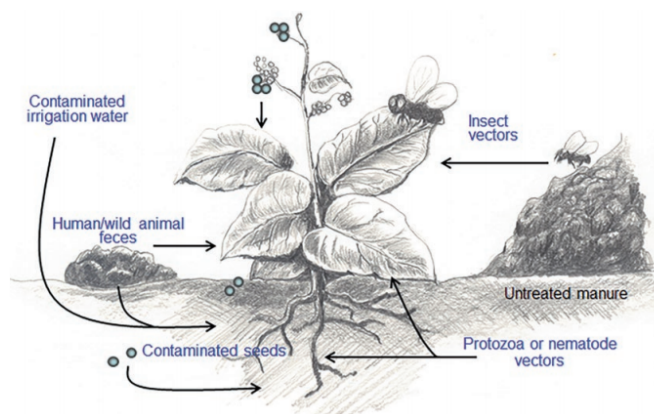
Las ETAs pueden producirse al ingerir alimentos o agua contaminada por microorganismos, parásitos y/o toxinas que estos puedan producir. Son llamadas así porque el alimento actúa como vehículo de transmisión de los organismos dañinos y/o las sustancias tóxicas. Globalmente, las ETAs son un problema de salud pública importante. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, en 2010, hubo 600 millones de enfermos por esta causa y 420,000 muertes asociadas (Lake & Barker, 2018). Las enfermedades graves de este tipo que conducen a la muerte pueden ocurrir en pacientes que desarrollan secuelas como síndromes neurológicos, hepáticos y renales, que se vuelven bacterémicos o tienen complicaciones durante o después de una intervención quirúrgica. Los infantes, los adultos mayores y las personas inmunodeprimidas, son generalmente más vulnerables y tienen mayor riesgo de complicaciones. Estas enfermedades, además pueden exacerbar otras que ya amenazaban previamente la vida de personas con afecciones médicas preexistentes. Todo esto trae como consecuencia graves pérdidas económicas por el costo de los tratamientos médicos y la falta de productividad (Barton Behravesch et al., 2011). Estos impactos no están restringidos a países de bajos ingresos, ya que un gran número de casos se reportan anualmente en países desarrollados. Estos impactos en la salud tienen consecuencias económicas para los afectados, para el sistema de salud, para los productores y distribuidores de alimentos, y las autoridades reguladoras (Lake & Barker, 2018).

Aunque numerosos países han realizado estudios para determinar el impacto de las ETAs, las estimaciones globales precisas siguen faltando. Estas estimaciones son complicadas debido a que muy pocas enfermedades pueden ser relacionadas directamente a ciertos alimentos en particular. En la gran mayoría de los casos, estas relaciones pueden ser hechas en situaciones de brotes, donde se puede ubicar específicamente al patógeno causante de la enfermedad y su vehículo de contaminación. Aunque no todas las enfermedades gastrointestinales son de origen alimenticio, los alimentos representan un importante vehículo para patógenos (Flint et al., 2005).

## 2.2 Patógenos bacterianos asociados a las ETAs

Muchos patógenos que pueden ser transmitidos por alimentos están presentes en la naturaleza y pueden ser encontrados en el suelo, agua, animales y plantas. Los patógenos son introducidos en los alimentos de distintas maneras dependiendo el producto. Las fuentes de contaminación por estos patógenos en frutas y verduras durante la precosecha incluyen el suelo, el agua de riego, el estiércol de animales inadecuadamente compostado, el polvo, los animales silvestres y domésticos, el manejo humano, el agua utilizada para rociar pesticidas, tratamientos foliares y hormonas de crecimiento; mientras que en la etapa poscosecha se incluye el manejo humano (trabajadores, consumidores), equipos de recolección, contenedores de transporte, animales salvajes y domésticos, plagas, polvo, agua de lavado y enjuague, clasificación, empaque, corte y procesamiento de equipos adicionales, contaminación cruzada, transporte, y ventas (Bhunia, 2008).

Los patógenos humanos asociados a alimentos cuentan con muchas herramientas que les permiten interactuar con los productos frescos, permitiéndoles su adherencia a superficie, utilizando su maquinaria bioquímica, así como múltiples compuestos. Estos patógenos se pueden unir como agregados y adherirse a la cera de la superficie o en las grietas de la cutícula del vegetal, siendo protegidos del estrés ambiental y otros factores desfavorables. Adicionalmente de su capacidad de adhesión, en ocasiones también pueden entrar en los tejidos de los vegetales mediante cortes, heridas, raíces, insectos o mordeduras (Fig. 1) (Barza, 2002).



**Figura 1.** Modos de transmisión de patógenos entéricos en frutas y vegetales. Recuperado de Bhunia, 2008.

El microbioma presente en los productos frescos puede coexistir con otros microorganismos patógenos para humanos (Tabla 1). Ejemplos de microorganismos que han provocado brotes asociados con consumo de frutas y verduras incluyen a *E. coli* O157:H7 en sidra de manzana, espinacas y lechuga; *E. coli* O104:H4 en germinados de alfalfa; *S. enterica* en melones, sandías, cilantro, tomates, germinados y almendras; y *L. monocytogenes* en repollo, apio, melón y manzanas. Estos eventos enfatizan la necesidad de un mayor saneamiento y procesamiento o una mejor garantía de calidad para asegurar los productos con procesamiento mínimo (Flint et al., 2005).

**Tabla 1.** Microorganismos asociados a frutas y verduras, patógenos de plantas y humanos encontrados comúnmente. Recuperado de Bhunia, 2008.

<b>Especies comúnmente encontradas en superficies de plantas</b>	<b>Patógenos de plantas y microorganismos de deterioro</b>	<b>Patógenos humanos</b>
<i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Agrobacterium spp.</i> , <i>Erwinia spp.</i> , <i>Clostridium</i> <i>spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Ralstonia spp.</i> , <i>Xanthomonas spp.</i> y <i>Xylella</i> <i>spp</i>	<i>E. coli</i> O157: H7, <i>Salmonella enterica</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>C.</i> <i>botulinum</i> y <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>

### 2.3 Resistencia a antibióticos y su importancia en la inocuidad alimentaria

Los antibióticos han revolucionado diversos ámbitos de la vida. Además de su función esencial en la clínica, los antibióticos se utilizan en una gran variedad de aplicaciones no médicas, desde la promoción del crecimiento del ganado hasta la preservación del deterioro de los huertos. Sin embargo, el uso excesivo amenaza su eficacia debido a la promoción y propagación de bacterias resistentes a los antibióticos. Los antibióticos atacan e inhiben los

procesos celulares esenciales, retardando el crecimiento y causando la muerte celular. Sin embargo, si las bacterias están expuestas a antibióticos por debajo de la concentración mínima bactericida (CMB), pueden mutar y adquirir resistencia al tratamiento con antibióticos mediante selección natural. Este cambio puede surgir de la adopción de una secuencia que codifica un gen de resistencia o por mutación en el cromosoma bacteriano. La preocupación en torno a la creciente prevalencia de bacterias resistentes a los antibióticos aumenta debido a la falta de descubrimientos de nuevos fármacos, ya que la mayoría de las clases de los disponibles actualmente en el mercado se descubrieron entre mediados y finales del siglo XX. Por lo tanto, quedan pocos para combatir las bacterias resistentes, y estas en muchas ocasiones ser resistentes a múltiples medicamentos a la vez (Richardson, 2017).

### **2.3.1 Uso de antibióticos en la agricultura**

La habilidad de los antibióticos para el tratamiento de enfermedades en humanos rápidamente fue reconocida como potencial para tratar problemas de origen bacteriano en plantas. Durante los años 50s, aproximadamente 40 antibióticos de origen bacteriano o fúngico fueron examinados para el control de enfermedades en plantas. Sin embargo, el número de antibióticos utilizados en agricultura es modesto en comparación de los usados en la medicina humana y veterinaria. Los antibióticos de grado planta están formulados en polvos con 17-20% de compuesto activo, suspendidos en agua a concentraciones de 50 a 300ppm y aplicados a las plantas en superficies aéreas. Al ser relativamente costosos, son utilizados exclusivamente en cultivos de alto valor y plantas ornamentales. Algunos ejemplos de antibióticos utilizados en cultivos se resumen en la Tabla 2. En Estados Unidos de América (EUA), se estima una utilización de 19,550 a 65,227 kg de antibióticos en cultivos anualmente, aunque no alcanza ni el 0.5% de la producción total de antibióticos (22,680,000 kg/año) (McManus et al., 2002).

**Tabla 2.** Antibióticos más comúnmente utilizados en la agricultura, su nombre comercial, blanco y plantas beneficiadas. Recuperado de McManus et al., 2002.

Antibiótico	Nombre comercial	Blanco	Cultivo
<b>Estreptomicina</b>	Agrept, Agri-mycin, Agri-step, Fructocin y Plantomycin	Control de tizón de fuego causada por <i>Erwinia amylovora</i>	Manzana, durazno, pera, cereza, fresno de la montaña, rosa, etc.
<b>Oxitetraciclina</b>	Biostat, Glomycin, Mycoshield, Terrafungine y Terramycin.	<i>Erwinia amylovora</i> <i>Xanthomonas arboricola</i>	Pera y manzana Durazno y nectarina
<b>Gentamicina</b>	Agry-gent	<i>Erwinia</i> , <i>Pectobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Ralstonia</i> y <i>Xanthomonas</i>	Manzana y pera

### 2.3.2 Uso de antibióticos en la ganadería

Los antibióticos se usan ampliamente como suplementos de crecimiento en el ganado. Se estima que el 80% de los antibióticos vendidos en EUA se usan en animales, principalmente para promover el crecimiento y prevenir una infección bacteriana que afecte dicho ganado. El tratamiento del ganado con antimicrobianos mejora la salud general de los animales, produciendo mayores rendimientos y un producto de mejor calidad, sin embargo, estos antibióticos pueden ser ingeridos por los humanos cuando consumen alimentos (Ventola, 2015).

El uso de antibióticos en ganadería también afecta el microbioma ambiental una vez que hasta el 90% de los antibióticos administrados al ganado se excretan en la orina y las heces, y luego se dispersan ampliamente a través del fertilizante, el agua subterránea y el

escurrimiento superficial. Si bien, esta aplicación representa una proporción mucho menor del uso general de antibióticos, la propagación geográfica debido a causas naturales resultante puede ser considerable. Esta práctica también contribuye a la exposición de microorganismos en el medio ambiente a los fármacos, alterando la ecología ambiental al aumentar la proporción de microorganismos resistentes frente a susceptibles (Ventola, 2015).

### **2.3.3 Aparición de la resistencia a antibióticos**

El uso de antibióticos siempre se ha asociado con el desarrollo de resistencia. De hecho, cada vez que se consume un antibiótico, elimina las células bacterianas susceptibles, seleccionando cepas que continúan creciendo en su presencia a través de un proceso de selección darwiniana. Una vez que esas variantes resistentes se multiplican, se convierten en la población bacteriana predominante y transmiten sus características de resistencia genética a la descendencia. Este fenómeno puede ocurrir en bacterias saprófitas, comensales y patógenas para humanos, animales y el medio ambiente (Richardson, 2017).

Los animales, peces y vegetales se consideran grandes reservorios de bacterias resistentes a los antibióticos, ya que la cadena de producción de alimentos es un ecosistema compuesto por diferentes nichos ecológicos, donde se usan grandes cantidades de antibióticos y coexisten numerosas bacterias. Existen dos vías biológicas principales involucradas en la evolución y el desarrollo de la resistencia a antibióticos. Primero, la resistencia puede estar mediada por un fenotipo preexistente en poblaciones bacterianas naturales, donde las bacterias acumulan errores en sus genes y transfieren los resistentes a las células de la progenie a través de la transferencia vertical de genes (TVG), lo que lleva a una resistencia. El segundo escenario, llamado resistencia adquirida, implica intercambios genéticos intra y entre especies bacterianas mediada por la transferencia horizontal de genes (THG) y la adquisición de nuevos genes resistentes alojados en elementos genéticos móviles, como plásmidos, integrones, transposones, secuencias de inserción y elementos relacionados con fagos. Dichos materiales genéticos se transfieren mediante distintos mecanismos que serán tratados más adelante (Founou et al., 2016).

### **2.3.4 Rutas de transmisión de GRAs a lo largo de la cadena alimentaria**

La propagación de bacterias resistentes a antibióticos (BRAs) es posible a lo largo de la cadena alimentaria a través del contacto directo o indirecto. El contacto directo ocurre

después de la exposición inmediata de humanos con animales y sustancias biológicas (como sangre, orina, heces, leche, saliva y semen), y mejora la rápida y fácil diseminación de bacterias resistentes de huésped a huésped. Los trabajadores expuestos, como veterinarios, granjeros, trabajadores de mataderos y manipuladores de alimentos, así como aquellos que están directamente en contacto con ellos, tienen un alto riesgo de ser colonizados o infectados con bacterias resistentes a los antibióticos. Aunque esta transmisión no apareció inicialmente como una amenaza a nivel de salud de la población, ahora se reconoce que los trabajadores expuestos y sus familias proporcionan una ruta probable para la entrada de BRAs y genes de resistencia a antibióticos (GRAs) en la comunidad y en los entornos de atención médica, donde los intercambios y la adquisición de mecanismos de resistencia son evidentes (Founou et al., 2016).

Una gran proporción de los antibióticos no se transforman en compuestos inactivos y conservan sus actividades después de su excreción. La diseminación de antibióticos activos, metabolitos o sus productos de degradación, denominados residuos de antibióticos, así como GRAs y bacterias resistentes excretadas a través de los desechos de los animales de alimentación, ha establecido al medio ambiente como otra reserva importante de resistencia. Los suelos agrícolas, el estiércol y las aguas residuales se han identificado como *puntos calientes* de contaminación por bacterias resistentes, y se han detectado residuos de antibióticos en todo el mundo. La THG también se ha documentado en nichos ambientales, como estiércol, agua y suelo. Muchos países en desarrollo utilizan desechos humanos y animales, sin el tratamiento adecuado, como fertilizante en tierras de cultivo y para la alimentación de peces y mariscos en acuicultura. Por lo tanto, la contaminación ambiental puede conducir a la aparición y propagación de nuevas BRAs y GRAs en los productos alimenticios, pescados, mariscos, vegetales y agua, que a su vez pueden colonizar o infectar a los animales y los humanos, lo que aumenta los riesgos para la salud pública. Estudios que determinen el resistoma bacteriano, la THG entre las BRAs presentes en los diferentes nichos, además de proporcionar evidencia filogenética, son necesarios para conocer las implicaciones y consecuencias de las BRAs, los GRAs y su transferencia indiscriminada entre especies en la cadena alimentaria (Holmes et al., 2016; Thanner et al., 2016; Verraes et al., 2013).

## 2.4 El melón como fuente de contaminación por microorganismos

Los melones pueden ser contaminados antes o durante la cosecha, en el empaquetado, almacenamiento y en el corte o preparación de los productos. El suelo, el estiércol compostado incorrectamente, el agua de riego contaminada, los animales silvestres y domésticos, y los trabajadores agrícolas son vehículos potenciales de contaminación de los melones antes de ser cosechados. Los microorganismos capaces de causar enfermedades humanas pueden sobrevivir en el suelo por largos periodos. Se ha visto que *L. monocytogenes* puede sobrevivir en el suelo al menos por 8 semanas, *Salmonella* spp. y *E. coli* O157: H7 puede sobrevivir hasta 23 semanas y algunos virus pueden sobrevivir durante varios meses. Aún y con las numerosas maneras que los patógenos tienen para poder colonizar y crecer en productos vegetales, la malla que cubre naturalmente la superficie de las cáscaras de melón puede facilitar la unión y supervivencia de los microorganismos del suelo o del agua de riego. Es bien sabido que algunas frutas y verduras antes de la cosecha pueden contaminarse internamente con patógenos entéricos a través de mecanismos de internalización propios de cada microorganismo; esto también puede ocurrir en los melones (Berger et al., 2010; Bowen et al., 2006).

Si bien, el objetivo del lavado del melón posterior a la cosecha es eliminar restos de suelo y limpiarlos, también puede contribuir a la contaminación. En las empacadoras, los productos frescos pueden albergar microorganismos en poblaciones de  $10^4$  a  $10^6$  UFC/g. Para algunas frutas y verduras, como melones, manzanas y tomates, se ha demostrado que una diferencia de temperatura negativa, es decir, realizar el lavado con agua más fría que la temperatura del producto favorece la infiltración de microorganismos en el tejido debajo de la superficie de la fruta. Uno de los microorganismos que se aprovecha de esta acción es *Salmonella*, y desafortunadamente encontrarla en el agua de lavado o de refrigeración es frecuente. Este problema puede complicarse aún más por las prácticas regionales y las condiciones ambientales. Algunos productores evitan exponer el producto al agua mejorando sus prácticas de manejo, otros concluyen que existe una mayor necesidad de lavado o aplicación de fungicida para limpiar los melones y mantener la calidad del producto. Algunos patógenos que se ha visto que han podido sobrevivir en la cáscara del melón por días incluyen a *E. coli*



O157:H7, *Salmonella* y algunos hongos que causan pudrición del fruto, quienes incluso propician la entrada de *Salmonella* dentro al melón debido a coinfecciones (Bowen et al., 2006).

## **2.5 ADN extracelular (ADNex)**

Las moléculas de ADN no son encontradas de manera exclusiva dentro de las células, sino que son un componente importante de medio extracelular. El ADNex ha detectado inclusive en sobrenadantes de cultivos líquidos de numerosas bacterias, como *Neisseria meningitidis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas stutzeri* y *P. aureginosa*, entre otras. Una de sus principales funciones es formar parte de la matriz extracelular de comunidades de biopelículas formadas por eubacterias, archaeas y hongos (Ibáñez de Aldecoa et al., 2017).

El fenómeno de liberación de ADNex no es simplemente observado en condiciones de laboratorio, sino que está ampliamente distribuido en ambientes naturales y puede ser encontrado en casi todas las muestras de ecosistemas acuáticos y terrestres colonizados por microorganismos. Este ADN puede ser originado en parte por la lisis de células, o por mecanismos específicos como autólisis, sistemas de secreción o asociación con vesículas membranales extracelulares que están regulados por procesos como *Quorum Sensing*. Los microorganismos emplean la comunicación intercelular dentro de grandes grupos de células para coordinar procesos como bioluminiscencia, producción de antibióticos, la formación de biopelículas o cuerpos fructíferos (Ibáñez de Aldecoa et al., 2017; Vlassov et al., 2007).

El término ADN<sub>e</sub> no debe ser confundido con el ADN extracelular, ya que el primero se refiere al ADN total que puede ser extraído de una muestra ambiental, representando una mezcla compleja entre ADN celular genómico de organismos vivos y ADN extracelular (Ibáñez de Aldecoa et al., 2017). El ADNex se ha definido de diferentes maneras: “ADN que no está asociado con la biomasa viva”, implicando que todo el ADN de los organismos muertos es extracelular. Otra definición más descriptiva indica que es “aquellas moléculas presentes o liberadas de células en las que la producción de energía ha cesado permanentemente, ADN viral y ADN secretado a partir de células metabólicamente activas”, por lo que el ADN dentro de células microbianas muertas estructuralmente intactas y tejidos animales y vegetales fosilizados no entraría en esta categoría. Esta discrepancia en distintas definiciones genera confusiones entre qué tomar como un ADNex. La incorporación del

ADN viral en la definición de ADNex también es problemática, ya que el ADN viral puede aparecer dentro de células como profago (un genoma viral integrado en el genoma del huésped), que puede ser el principal modo de proliferación viral en algunos ambientes. Aunque sea difícil separar el ADN extracelular del ADN ambiental, el ADN ambiental se aplica comúnmente al ADN extraído directamente de muestras ambientales, independientemente de si es intracelular o extracelular o asociado a biomasa u organismos muertos (Ramírez et al., 2018).

En este trabajo se manejará el término ADNex el cual finalmente definiremos como....

### **2.5.1 ADNex en ambientes acuáticos**

En ecosistemas marinos, oceánicos y de agua fresca, el término “ADN disuelto” es utilizado para referirse a toda la cantidad de ADN que puede ser extraído de muestras de agua, debido a que es difícil distinguir entre todos los ácidos nucleicos presentes como moléculas puras, ADN encapsulado en partículas virales o ultramicrobacterias ( $<0.2\ \mu\text{m}$ ) o unido a coloides (Fig. 2). Se ha estimado que, en muestras marinas, el 50% está en forma de ADNex, 17-30% existe asociado a partículas virales o coloides y el resto forma parte de bacterias y otros eucariotes (Nielsen et al., 2007).

Este ADN disuelto es una forma de ADNex que puede pasar un filtro de  $0.2\ \mu\text{m}$  y se encuentra en concentraciones de  $0.2$  a  $88\ \mu\text{g/l}$  en agua salada y de  $1$  a  $17\ \mu\text{g/l}$  en agua dulce, sin embargo, estos rangos se pueden ampliar dependiendo la procedencia de la muestra, su manejo y preservación. El ADNex puede jugar un papel diferente en distintos ecosistemas. Ha sido reportado que forma parte de la mayoría de la materia orgánica en ecosistemas marinos, así como que el tamaño de estas moléculas afecta la diversidad de los microorganismos en crecimiento. Otras características específicas han sido demostradas para el ecosistema marino, como que la concentración de ADNex disminuye con el incremento de la distancia a la costa y con la profundidad y que el ADN se degrada más rápido a profundidad que en la superficie (Vlassov et al., 2007).

Estudios previos proporcionaron evidencia de que una fracción importante del ADN extracelular puede escapar de los procesos de degradación, permaneciendo preservados en el ambiente. Este ADN representa, un repositorio genético potencial que registra los procesos biológicos que ocurren a lo largo del tiempo. La preservación del ADN también podría

favorecerse en sistemas caracterizados por altos insumos de materia orgánica y tasas de sedimentación. La distribución espacial de la diversidad procariótica ha sido intensamente estudiada a través del análisis del "ADN ambiental" (Corinaldesi et al., 2018). Los sedimentos marinos de aguas profundas son el mayor reservorio de ADN en los océanos del mundo, tienen una concentración de ADN<sub>ex</sub> en los sedimentos 4.3 veces más alta que el ADN asociado con toda la comunidad bacteriana, y 2–3 veces más alta que la concentración en el agua. Se ha encontrado una concentración de ADN<sub>ex</sub> máxima de 1,950 ng/g, sin embargo, es más habitual encontrar concentraciones de ~80 µg/g siendo altamente estable, mediante la adsorción, protegido contra la hidrólisis y las ADNasas. Se han encontrados tasas de transformación más rápidas en los sedimentos que en agua apoyando la idea de que los sedimentos y las partículas del suelo están mejorando la THG al preservar el ADN y facilitar la transformación de microorganismos naturalmente competentes (Corinaldesi et al., 2018; Torti et al., 2015).

### **2.5.2 ADN<sub>ex</sub> en suelos**

El suelo es un ambiente rico en ácidos nucleicos que parece estar mayormente concentrado en las capas superiores. Se ha estimado que hasta un 70% de las moléculas de ADN presentes en el suelo son de origen fúngico. Típicamente, alrededor de 80 µg de ADN se puede aislar por cada gramo de suelo, por lo tanto, la fracción de ADN bacteriano extracelular es difícil de cuantificar porque los métodos aplicados para la purificación de ADN<sub>ex</sub> sin involucrar a las células no son siempre eficaces. Sin embargo, se ha estimado que entre 0.03 a 1 µg de ADN/g está presente en forma extracelular. Se pueden encontrar nucleasas que controlan la concentración de ADN en el suelo, siendo la mayoría proveniente de bacterias, aunque, a pesar de esto, la presencia de fragmentos de ADN libres persiste en suelos agrícolas por largos periodos de tiempo, detectándose hasta 1000 pb presentes por hasta 2 años en suelos utilizados para la plantación de distintos productos como tabaco y betabel (Nielsen et al., 2007).

La cinética de la degradación del ADN en bacterias del suelo se ha estudiado en microcosmos de laboratorio utilizando inóculos vivos, suspensiones de células bacterianas muertas o ADN purificado. Si bien muchos de estos estudios se han centrado en la persistencia física del ADN en el suelo, también se ha estudiado la capacidad de dicho ADN para integrarse en bacterias

mediante ensayos de transformación y placas selectivas, comprobando que utilizando técnicas moleculares sensibles, pueden detectarse incluso después de semanas al ADNex del medio (Levy-Booth et al., 2007).

Probablemente, la lisis de las células muertas sea la principal fuente de ADNex en el suelo. Sin embargo, su integridad se puede ver comprometida debido a la presencia de endonucleasas activas. Además de la lisis, las bacterias pueden liberar ADN por expulsión. El ADN expulsado es generalmente más puro que el ADN liberado de las esporas germinadas y las células lisadas, ya que este último suele estar asociado con proteínas, ARN, residuos de la membrana celular, polisacáridos y otros constituyentes celulares (Levy-Booth et al., 2007; Pietramellara et al., 2009).

### **2.5.3 Liberación de ADNex por bacterias**

El ADN no encerrado en las células vivas puede provenir de células que lo liberan por vías pasiva y activa (Nielsen et al., 2007).

#### **2.5.3.1 Liberación pasiva**

La liberación pasiva de ADN de procariotas se produce junto con la muerte celular después del ataque viral, la predación por parásitos o la exposición a agentes citotóxicos, que a menudo conducen a la ruptura celular y la liberación del contenido citoplásmico, incluido el ADN. En el caso del ataque por virus, la destrucción de la célula infectada y su membrana, seguida por la liberación del contenido citoplásmico, es el paso final en el ciclo lítico viral liberando la nueva generación viral al medio ambiente. Se sabe que los protistas fagotróficos liberan el exceso de nutrientes de las bacterias ingeridas, incluyendo la mayoría del ADN adquirido. Esto ocurre porque, en comparación con los eucariotas, las bacterias tienen una mayor proporción de fósforo en la biomasa y, por lo tanto, suministran a sus depredadores más fósforo del que se necesita para el crecimiento (Torti et al., 2015).

#### **2.5.3.2 Liberación activa**

El ADN excretado activamente es naturalmente más puro que el ADN de las células muertas, que está acompañado de sales inorgánicas, proteínas, ARN, residuos de la membrana celular, polisacáridos y otros constituyentes del citoplasma celular y la membrana. Algunas bacterias como *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*,

*Neisseria* y *Pseudomonas* se sabe que liberan ADNex al medio durante su crecimiento (Nielsen et al., 2007).

La liberación activa de ADN puede ocurrir por distintos mecanismos. Para la transferencia genética a través de la conjugación bacteriana, se utiliza el sistema de secreción de tipo IV, que requiere contacto célula-célula. Este sistema posibilita la difusión de información genética a través de la población y la utilización del ADNex para la adquisición de nutrientes o la formación de biopelículas sin reducir la población celular ni promover la respuesta inmune del huésped (Vorkapic et al., 2016).

El ADNex también se puede encontrar en asociación con vesículas de membrana externa (VMEs) en especies de bacterias Gram-negativas. En *Helicobacter pylori* y *P. putida*, las VMEs promueven la formación de biopelículas, mientras que en *A. baumannii*, contribuye a la disponibilidad total de ADN. La exportación de ADN a través de vesículas de membrana se ha observado durante mucho tiempo como una característica de las especies Gram-negativas, aunque también se ha reportado en algunas Gram-positivas como *Streptococcus mutans*. Las VMEs que contienen ADN aumentan la eficiencia de captación de este y la recombinación genética en *H. influenzae* y *E. coli*, ya que en este entorno el ADN asociado a vesículas está protegido de la degradación y pueden fusionarse de manera eficiente en la membrana celular. El número de microorganismos que liberan ADN dentro de las VMEs está aumentando, como la cianobacteria marina *Prochlorococcus*, *P. aeruginosa* y la arqueas hipertermofílicas *Thermococcus* y *Pyrococcus*. Se sabe que el ADN liberado por algunas cepas cumple una función estructural al estabilizar y fortalecer las biopelículas (Nielsen et al., 2007; Vorkapic et al., 2016).

#### **2.5.4 Factores que afectan la estabilidad del ADNex**

Muchos factores químicos y físicos afectan la integridad del ADN en el ambiente. El ADNex puede ser degradado por nucleasas, modificado químicamente, cortado o estabilizado por unión a superficies minerales o sustancias orgánicas, alterado por temperatura o radiación. Tales mecanismos se describirán a continuación.

##### **2.5.4.1 Degradación enzimática por ADNasas**

La degradación enzimática causa el rompimiento de la mayoría del ADNex presente en el ambiente. Las enzimas responsables de esta degradación, las ADNasas, se encuentran en la

mayoría de los hábitats microbianos. Las ADNasas convierten el ADN en desoxirribosa, ortofosfato inorgánico y bases nitrogenadas, permitiendo a los microorganismos utilizar ADN como fuente de carbono, nitrógeno, fósforo y precursores de ácidos nucleicos. Dependiendo de su modo de acción, las nucleasas que degradan los sustratos de ADN se clasifican como desoxirribonucleasas específicas de azúcar (exo-desoxirribonucleasas, endo-desoxirribonucleasas y endonucleasas de restricción) o nucleasas no específicas de azúcar (endonucleasas y exonucleasas). La actividad nucleasa microbiana puede ser extracelular, asociada a la superficie celular o intracelular. Las nucleasas extracelulares son raras y sólo se han observado en ciertos grupos bacterianos (Nielsen et al., 2007).

#### **2.5.4.1.1 Actividad nucleasa en suelo**

La actividad enzimática en el suelo depende de las enzimas celulares presentes en células activas o inactivas, células muertas o residuos celulares y de las enzimas extracelulares que se encuentran libres en solución o adsorbidas por coloides del suelo o materiales orgánicos. En particular, la actividad de las enzimas extracelulares estabilizada por coloides es importante, porque usualmente resisten factores de estrés ambientales. Las nucleasas extracelulares no adsorbidas son raras y cuando están presentes son de corta duración en el suelo debido a la presencia de otras sustancias que las llevan a sufrir una inactivación (Pietramellara et al., 2009).

#### **2.5.4.1.2 Actividad nucleasa en ambientes acuáticos**

La mayoría de la actividad nucleasa se ha encontrado en partículas suspendidas y bacterias en lugar de estar disueltas. En un ambiente marino se ha visto que la asociación a sedimentos como la arena, le confiere al ADN una protección contra la degradación debido a una reducción en su accesibilidad. Esto mismo se ha observado en suelos ya que ofrecen superficies adsorbentes como arcillas, óxidos e hidróxidos, y son capaces de atrapar moléculas como proteínas y ácidos nucleicos en la matriz. En contraste, la adsorción o atrapamiento de tales moléculas en agua se produce con menos frecuencia porque el ambiente es menos estructurado y más homogéneo que los suelos y los sedimentos (Torti et al., 2015).

#### **2.5.4.2 Inactivación química o física**

Numerosas condiciones físicas y compuestos químicos comprometen severamente la integridad del ADN expuesto a ambientes extracelulares. Además de la temperatura, la

integridad de las moléculas de ADN es vulnerable a radiación. La radiación gamma, utilizada para la esterilización de alimentos, provoca la fragmentación del ADN siendo inactivado. Adicionalmente, muchos productos químicos presentes en el ambiente son mutágenos de ADN. Se considera actualmente que los agentes biológicos representan la principal causa de degradación del ADNex (Nielsen et al., 2007).

#### **2.5.4.3 Efectos de la fragmentación en la actividad biológica del ADN**

La actividad endonucleasa y factores físicos y químicos causan la presencia de ADN de cadenas más pequeñas. Los tamaños de ácidos nucleicos son cruciales para los efectos genéticos que puedan causar en las bacterias. Estos efectos pueden ser causados por fragmentos cortos (<1 kb) o fragmentos largos (>10 kb). El ADN de cadena larga es más eficiente en el proceso de transformación y puede también introducir nuevas capacidades de producción de proteínas. Se han reportado especies de *Pseudomonas* que por transformación natural obtuvieron fragmentos de ADN cromosomal de hasta 15 kb o fragmentos de 3 kb codificantes para resistencia a rifampicina. Se ha evaluado también la absorción de fragmentos de ADN, alcanzando 76% de fragmentos incorporados de 100 pb después de 6 horas de incubación, 52% de fragmentos de 250 bp y 45% de 569 pb, por lo tanto, dependiendo de la longitud de la secuencia, puede reducir la toma de esta por la bacteria. Genes de resistencia a antibióticos como los codificantes de beta-lactamasas o aminoglicósidos, por ejemplo, están generalmente en el rango de 700-1,000 pb, por lo que dependiendo el gen cambia el tamaño. Sin embargo, la degradación sigue siendo un factor a considerar, ya que ADN altamente degradado es muy poco probable que pueda conferir capacidades nuevas (Nielsen et al., 2007).

#### **2.5.5 Funciones del ADNex**

Las bacterias pueden usar el ADNex para varias funciones clave, como el componente estructural de las biopelículas, la fuente de nutrientes y para la THG (Pietramellara et al., 2009).

### **2.5.5.2 ADNex como sustrato en la transferencia de información genética**

Para que ocurra la transferencia horizontal de genes a través de mecanismos como la conjugación y la transducción se requiere que exista disponibilidad de ADN extracelular para las bacterias competentes. Se ha demostrado una relación reguladora entre el desarrollo de la competencia y la generación de ADNex por algunas bacterias, donde la liberación de ADN cromosómico es parte de un proceso lítico controlado por el sistema de competencia. Esto asegura que la decisión de la población de dirigir la energía hacia el desarrollo de bacterias competentes sea recompensada al proporcionar el sustrato para la captación al mismo tiempo. La liberación de ADNex homólogo por una población competente facilitaría la integración mediante recombinación homóloga en otra población capaz de aceptarlo. Ese ADN, sin embargo, no proporciona diversidad y posiblemente ningún tipo de ventaja, por lo tanto, la diversidad es más probable que se logre incorporando ADN heterólogo de especies que son ecológicamente similares y no de origen, incrementando así las posibilidades de nuevas bacterias con nuevas funciones relacionadas a factores de virulencia o resistencia a antibióticos (Roberts & Kreth, 2014).

### **2.5.5.3 ADNex como fuente de nutrientes**

El ADNex es un compuesto abundante en ambientes naturales y es una fuente potencial de energía y nutrientes como C, N y P. Específicamente, el ortofosfato suele ser un nutriente limitante en una amplia variedad de ambientes. En los ecosistemas acuáticos se ha descrito que una gran variedad de microorganismos son capaces de usar el ADNex como fuente de nutrientes, reciclarlo y mineralizarlo; sin embargo esto no parece ser una capacidad universal ya que el ADNex es abundante y persistente en el medio ambiente (Ibáñez de Aldecoa et al., 2017).

La investigación en sistemas acuáticos ha descrito el uso de ADNex como fuente de energía y carbono por una variedad de bacterias, que se pueden clasificar en dos grupos según el peso molecular del ADNex que puedan usar. Por lo general, pueden crecer con moléculas de bajo peso molecular o de alto peso molecular, sin embargo, muy pocas bacterias pueden usar ambas. Las bacterias capaces de crecer con ADNex de bajo peso podrían usar nucleasas extracelulares para degradarlo y absorber los monómeros para su uso. Por otro lado, las



bacterias capaces de crecer con el ADN<sub>Nex</sub> de alto peso podrían captar moléculas de ADN intactas mediante la competencia, en cuyo caso la molécula de ADN completa podría usarse como fuente de nutrientes o con fines genéticos (Ibáñez de Aldecoa et al., 2017).

## **2.6 Transferencia horizontal de genes (THG)**

La THG es común en muchas especies bacterianas y se ha vuelto relevante en las últimas décadas al facilitar la propagación de la resistencia antimicrobiana y de otros determinantes de virulencia. La THG se define como el movimiento de material genético hereditario ya sea que altere o no el genoma del receptor, es frecuentemente impulsado por elementos genéticos móviles (EGMs). Los EGMs codifican al menos para parte de la maquinaria requerida para su transferencia entre células (transmisión horizontal) y, en consecuencia, activan dos de los tres mecanismos principales de THG en las bacterias: la conjugación y la transducción. El tercer mecanismo para la THG es la transformación, que no es impulsada por EGMs, sino que es facilitada por una maquinaria de competencia codificada por la misma bacteria. Plásmidos, bacteriófagos y ADN extracelular son los tres principales impulsores del THG a través de los procesos de conjugación, transducción y transformación natural, respectivamente (Lerminiaux & Cameron, 2019; von Wintersdorff et al., 2016).

### **2.6.1 Transformación**

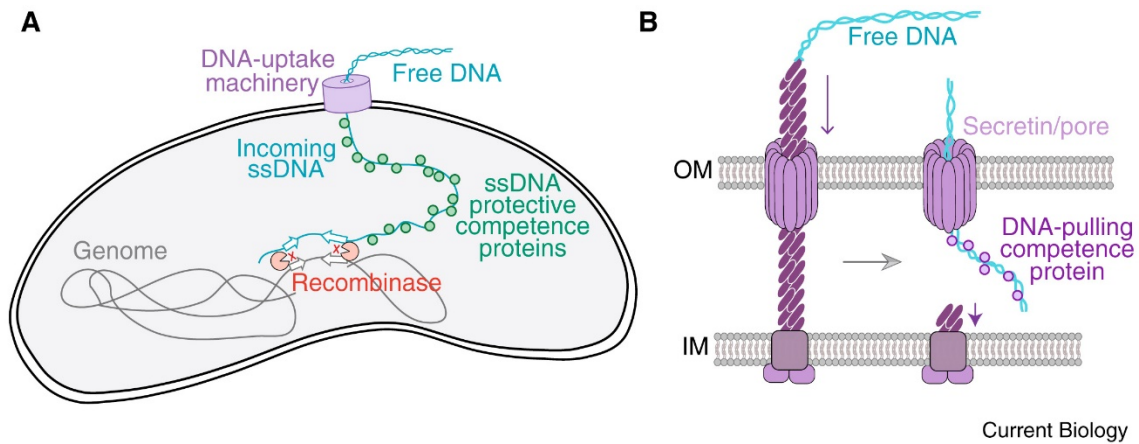
La transformación bacteriana es un proceso que involucra al ADN extracelular y a la célula receptora. La internalización del ADN extracelular y la integración en el genoma del receptor por recombinación homóloga permite a las bacterias adquirir nuevos rasgos genéticos y adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes, promoviendo, por ejemplo, la resistencia a los antibióticos. A diferencia de otros mecanismos de transferencia horizontal de genes, como la transducción y la conjugación, la transformación es dirigida completamente por la célula receptora y todas las proteínas requeridas están codificadas en su genoma. La mayoría de las bacterias transformables no expresan permanentemente las proteínas involucradas, sino que requieren condiciones específicas para desarrollar la competencia para la transformación genética. La competencia es, por lo tanto, una "ventana de oportunidad" transitoria para la internalización del ADN y, por lo tanto, permite una transformación posterior (Johnston et al., 2014).

Para que la transformación tenga lugar, se deben cumplir varias condiciones: debe haber ADN presente en el ambiente extracelular; las bacterias receptoras deben estar en un estado de competencia; y el ADN translocado debe estabilizarse, ya sea por integración en el genoma del receptor o por re-circularización (en el caso del ADN plasmídico). La exposición a los antibióticos puede inducir la competencia en muchas especies de bacterias, lo que significa que los antibióticos no solo seleccionarían cepas resistentes, sino que también estimularían la transformación de GRAs (von Wintersdorff et al., 2016). Así como los GRAs son intercambiados entre bacterias, algunos factores de virulencia también se pueden liberar al medio y ser tomados por otra bacteria a su conveniencia (Kelly et al., 2009).

#### **2.6.1.1 La maquinaria de toma de ADN inducida por competencia**

Los regulones de competencia pueden contener hasta más de 100 genes, sin embargo, solo algunos son requeridos para el proceso de transformación. Entre estos se incluyen los que codifican al aparato de toma de ADN, las proteínas que median la protección del ADN que entra al citoplasma y las que inician el reclutamiento de la enzima de recombinación. Esta máquina permite la translocación del material genético a través de la envoltura celular y es usualmente compuesto por más de 10 diferentes proteínas conservadas entre especies competentes (Mell & Redfield, 2014).

La parte central del complejo de toma de ADN es un pili tipo IV que comparte homología con los sistemas de secreción tipo II. Sin embargo, al contrario de estos últimos que sacan sustratos del espacio periplásmico afuera de la célula, el pili trabaja de manera opuesta. La retracción del pili resulta en la apertura de un poro de secretina en la membrana externa en organismos Gram-negativos (Figura 2B), o puede liberar espacio en el denso peptidoglicano de Gram-positivos, permitiendo la entrada de ADN. Una vez que el pili se retracta, proteínas de competencia periplásmicas, unidas a la membrana o citoplasmáticas empujan el ADN hacia regiones aún más profundas dentro de la célula. Este ADN es de cadena sencilla e inmediatamente protegido para prevenir su degradación. Finalmente, la recombinasa de RecA es reclutada y polimeriza en la cadena, que después de una búsqueda de homología, resulta en recombinación homóloga (Figura 2A) (Blokesch, 2016).



**Figura 2.** Maquinaria de toma de ADN libre. A) El ADN libre es captado por el aparato de toma de ADN y eventualmente se inserta por completo en el citosol de la bacteria competente. Este ADN es protegido de degradación y se recluta a la recombinasa, quien media su integración en el genoma. B) Vista detallada del aparato de toma de ADN de una bacteria Gram-negativa naturalmente competente. Recuperada de Blokesch, 2016.

### 2.6.1.2 Funciones de la competencia natural y el ADN libre

La competencia y la transformación se han visto habitualmente como adaptaciones para promover la recombinación homóloga y la diversificación genética. Sin embargo, aunque la transformación claramente puede tener beneficios evolutivos a largo plazo, la selección natural que actúa sobre células competentes individuales no puede prever estos, y las ventajas selectivas inmediatas de la absorción de ADN para la célula son rara vez claras. Se espera que la mayoría de los eventos de transformación sean neutrales o perjudiciales, y los beneficios más inmediatos y confiables de la captación de ADN surgen de la reparación del ADN y la adquisición de nucleótidos como fuente de nutrientes y para la síntesis de ácidos nucleicos para la bacteria. Una visión más extrema es que la absorción de ADN también podría ser en parte una consecuencia espontánea y no esperada de las actividades de adhesión y motilidad del pili tipo IV que presentan las bacterias, aunque la regulación coordinada de los genes de este pili responsables de la absorción de ADN y los genes que no forman parte del pili tipo IV que aún así son responsables de la translocación del ADN libre en el citoplasma, prueba que podría ser contrario a lo espontáneo. Las proteínas citoplasmáticas inducidas por la competencia co-reguladas con genes del pili tipo IV adquieren especial importancia al resaltar la pregunta de si el ADN libre y la respuesta generada en la célula son

modulaciones debidas a su entorno inmediato o adaptaciones específicas para promover la transformación (Mell & Redfield, 2014).

### **2.6.1.3 Transformación natural por *Acinetobacter***

*Acinetobacter baumannii* es un patógeno oportunista que ha causado enormes problemas de salud pública alrededor del mundo por su impresionante habilidad para desarrollar resistencia a antibióticos. Por lo tanto, los eventos de THG contribuyen considerablemente al desarrollo alarmante de la resistencia. Entre los mecanismos de THG, la transformación natural provee una ruta conveniente para el intercambio genético y ha sido demostrado múltiples veces en *A. baumannii* y otras especies de *Acinetobacter*. La mayoría de los plásmidos secuenciados de este género no tienen los genes requeridos para la transferencia por conjugación, por lo que se propone que la transformación natural puede tener un papel importante para la transferencia de plásmidos entre estas bacterias (Hu et al., 2019).

### **2.6.2 Conjugación**

La conjugación es la transferencia de ADN a través de un proceso de múltiples pasos que requiere el contacto célula a célula a través de un pili de superficie celular o adhesinas. Se facilita mediante la maquinaria conjugativa que está codificada por genes en plásmidos que se replican de manera autónoma o por elementos conjugativos integrativos en el cromosoma (Sun, 2018).

Los GRAs se asocian en muchos casos con elementos conjugativos tales como plásmidos o transposones. Si bien la transferencia de estos elementos también puede ocurrir a través de la transformación o la transducción, la conjugación a menudo se considera como el principal mecanismo responsable, ya que proporciona una mejor protección contra el entorno y un medio más eficiente para ingresar a la célula huésped y a menudo tiene un rango de huéspedes más amplio que la transducción de bacteriófagos (Kelly et al., 2009).

### **2.6.3 Transducción**

La transducción se reconoce como un mecanismo para transferir GRA, especialmente entre miembros de la misma especie. La transducción ocurre cuando las partículas virales transfieren genes bacterianos. Después de la infección con un bacteriófago, el ADN bacteriano a veces se empaqueta accidentalmente en una cápside de bacteriófago. Una

cápside que contiene ADN bacteriano es completamente capaz de unirse a una célula receptora e inyectar el ADN extraño. Si el ADN bacteriano transferido se recombina en el genoma de la célula receptora, se produce la transducción (Lerminiaux & Cameron, 2019).

Los bacteriófagos desempeñan un papel importante en la configuración del microbioma bacteriano en cualquier entorno al transferir genes que son ventajosos para sus huéspedes microbianos, lo que a su vez promueve su propia supervivencia y diseminación. Las secuencias de ADN transferibles van desde el ADN cromosómico hasta los EGMs, como plásmidos, transposones e islas genómicas (Brown-Jaque et al., 2015).

La movilización o transferencia de GRA por bacteriófagos se ha documentado para varias especies bacterianas: eritromicina, tetraciclina o resistencias múltiples entre cepas de *S. pyogenes*; genes de resistencia a tetraciclina y gentamicina entre enterococos; el transporte de genes de  $\beta$ -lactamasa por bacteriófagos en *E. coli* y *Salmonella*; o la transferencia de plásmidos de resistencia a antibióticos en *S. aureus* resistente a meticilina (Lerminiaux & Cameron, 2019).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El aumento de la prevalencia de microorganismos resistentes a antibióticos se ha relacionado con la presión selectiva provocada por el uso de estos fármacos tanto en entornos clínicos como agrícolas. Sin una regulación adecuada, se cree que el ambiente asociado a la producción agrícola es un reservorio grande y diverso para bacterias resistentes que al portar genes de resistencia podrían facilitar la propagación de estos a otros organismos patógenos causando un problema mayor. De manera especial, el melón, gracias a su corteza exterior rugosa, podría ayudar al crecimiento y diseminación de bacterias y genes, entre los microorganismos presentes en el ecosistema alrededor de su superficie. Además, está en constante contacto con el suelo, fuente abundante de bacterias.

Una vez las bacterias unidas al exterior del melón podrían sobrevivir en forma de biopelícula causando que haya liberación de ADN extracelular (ADNex). La transferencia de genes se vería estimulada ya que el ADNex sería tomado del medio mediante un mecanismo conocido como transformación natural. Esta transformación genética de manera natural, con una presión ambiental presente y los genes correctos disponibles, podría integrar y permitir la expresión de genes para la supervivencia de las bacterias confiriéndoles una nueva ventaja sobre otras.

Se han reportado múltiples bacterias resistentes a antibióticos presentes en distintos cultivos de productos vegetales y frutas. En el melón particularmente, *E. coli*, *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* y otras bacterias pueden formar redes alrededor de la fruta debido a su superficie rugosa, capacidad que se ve facilitada por la producción de ADNex.

Por lo tanto, en este trabajo se analizó la presencia de ADN extracelular en el ambiente agrícola de producción del melón con la finalidad de encontrar secuencias de genes de resistencia que pudieran propiciar la transformación genética y la mejora de su maquinaria de resistencia a diversos antibióticos y establecer su capacidad para poder integrarse en microorganismos no resistentes. Además, determinar si este ADN es capaz de transformar de manera natural a *Acinetobacter baumannii* y aportarle una nueva resistencia que no poseía.

## **4. HIPÓTESIS**

Existen genes de resistencia a antibióticos (GRA) en el ADN extracelular (ADNex) asociados al ambiente de producción del melón que tienen la capacidad de insertarse y expresarse en bacterias receptoras.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Analizar la presencia genes de resistencia a antibióticos en ADN extracelular asociado al ambiente de producción del melón y determinar su capacidad para integrarse en microorganismos que no los poseen.

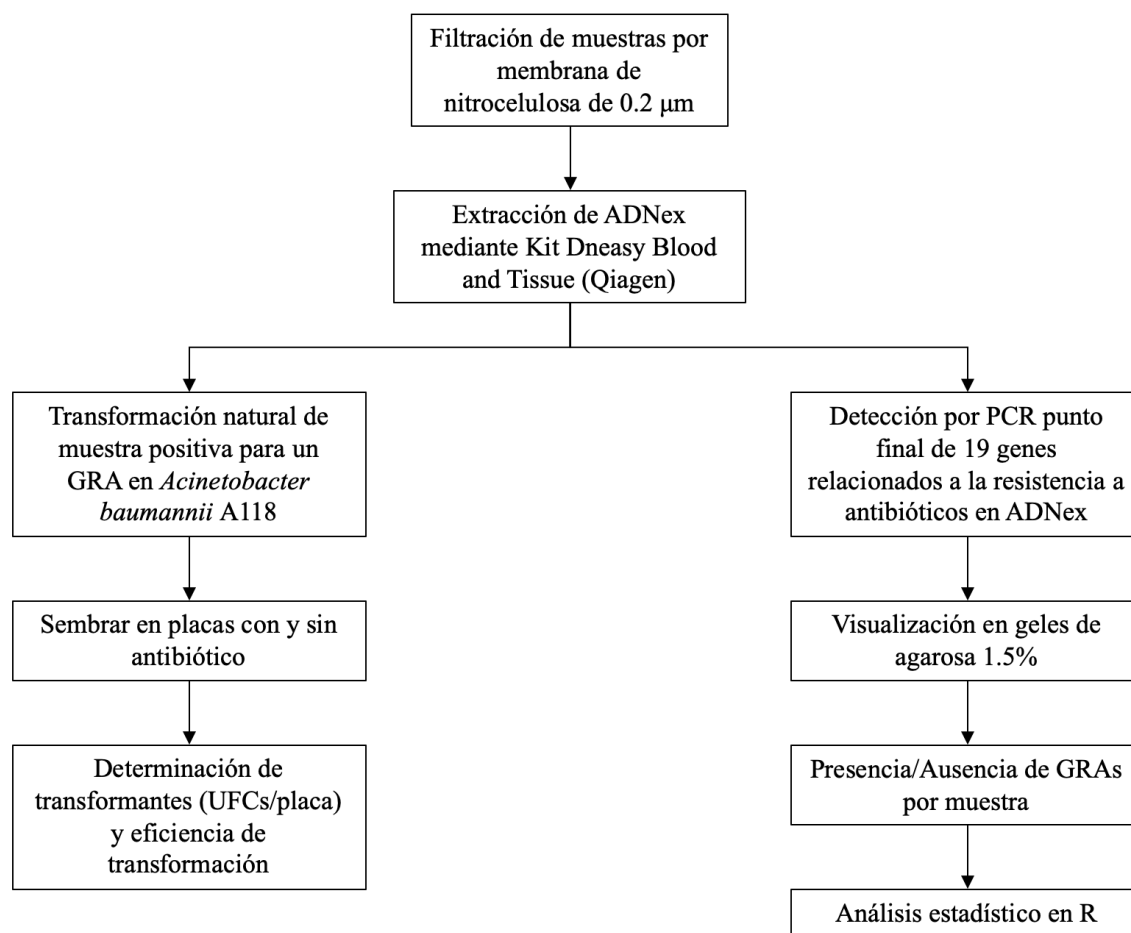
### **5.2 Objetivos específicos**

1. Realizar la extracción de ADN extracelular de muestras de agua de riego, lavados tanto de melones como manos de pizcadores en huertas de melón localizadas en la región de Paila, Coahuila de Zaragoza.
2. Identificar la presencia de genes en ADN extracelular relacionados a la resistencia a antibióticos de muestras de agua de riego, lavados de melones y manos de pizcadores en huertas de melón localizadas en la región de Paila, Coahuila de Zaragoza.
3. Analizar la correlación entre los genes de resistencia a antibióticos presentes en el ADN extracelular dependiendo de la procedencia de las muestras (agua de riego, lavados de melones y manos de pizcadores) en huertas de melón localizadas en la región de Paila, Coahuila de Zaragoza.
4. Evaluar la capacidad de transformación con la cepa de *Acinetobacter baumannii* A118 de un gen de resistencia a antibiótico obtenido del ADN extracelular de muestras de agua de riego, lavados de melones y manos de pizcadores en huertas de melón localizadas en la región de Paila, Coahuila de Zaragoza.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Diagrama general de los procedimientos realizados



### 6.2 Obtención de muestras

Las muestras fueron recolectadas en tres huertas de melón de la región de Paila, Coahuila de Zaragoza, México durante tres visitas realizadas en los meses de junio y julio de 2017. En total se recolectaron 201 muestras, 67 durante la visita 1, 66 en la visita 2 y 68 en la visita 3, divididas en tres tipos distintos, las que provenían de lavados de melones, las que fueron tomadas del sistema de riego de los melones y las que eran de lavados de manos de pizcadores.

Las muestras procedentes de melón eran compuestas cada una por el lavado con agua peptonada estéril al 0.15 % de seis melones proporcionados por los pizcadores, formando un total de 100 muestras compuestas, 36 en la visita 1, 33 en la visita 2 y 31 en la visita 3.

Las muestras provenientes de agua se dividieron en las que fueron tomadas desde los sistemas irrigación y las de la fuente. Se colectaron en total 36 muestras, la mitad de estas de irrigación y el resto de fuente, específicamente 12 en cada visita.

Las muestras originarias de los lavados de manos de pizcadores fueron en total 65 muestras, 19 en la visita 1, 21 en la visita 2 y 25 en la visita 3, todas de trabajadores que se encontraban dentro del área de recolecta de melón. Cada muestra consistía en el lavado de sus manos (una por una) en agua peptonada estéril al 0.15%.

Todas las muestras fueron procesadas en las siguientes 48 h, donde 20 a 100 ml de cada una de las muestras fueron sometidas a una filtración previa con una membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (Merck Milipore, Burlington, MA) estéril y el filtrado fue colocado en bolsas Nasco de 118 ml. Los filtrados libres de bacterias fueron almacenados en ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  desde ese momento hasta su procesamiento en junio de 2019.

### **6.3 Procesamiento y obtención de ADNex**

#### **6.3.1 Filtración por membrana**

Se utilizó el método de filtración por membrana (sistema de filtración con vacío Pall Corporation) para la concentración del ADNex. Cada muestra se hizo pasar por una membrana de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  (Merck Milipore, Burlington, MA) estéril. Esta membrana se utilizó para la extracción de ADNex total.

#### **6.3.2 Extracción de ADN extracelular**

Se colocó cada membrana de nitrocelulosa por separado en un tubo cónico Falcon de 15ml y se le añadieron 500 $\mu\text{l}$  de amortiguador GITC (Isotiocianato de Guanidina 5M (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), EDTA 100mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), Sarkosly 0.5% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)), para la extracción del material genético de acuerdo con el protocolo de DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania), según las especificaciones del fabricante. La concentración y calidad de los productos obtenidos se determinó mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Spectrophotometer, Thermo Scientific, Waltham, MA).

## 6.4 Detección de genes por PCR punto final

El ADN extracelular obtenido se sometió a la detección de los genes de resistencia a antibióticos enlistados en la Tabla 3 y elementos móviles genéticos encontrados en la Tabla 4.

**Tabla 3.** Secuencias de oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento para la detección de genes de resistencia a antibióticos utilizados en este estudio.

Grupo de antibióticos	Cebador	Secuencias (F: forward, R: reverse) 5'-3'	Temperatura de alineamiento (°C)	Amplicón (pb)	Referencia
B-lactámicos	<i>blaCARB-4</i>	F: TAATAAGAAAAGCAAGTAGGA R: AACTATGATTGGGGATTGAG	47.4	435	Marti et al., 2013
	<i>blaOXA-5</i>	F: AGCCGCATATTTAGTTCTAG R: ACCTCAGTTCCTTTCTCTAC	51	664	
	<i>blaSHV</i>	F: GGTTATGCGTTATATTCGCC R: TTAGCTTTGCCAGTGCTC	53	865	
	<i>blaCTX-M-1</i>	F: GGTTAAAAAATCACTGCGTC R: TTGGTGACGATTTTAGCCGC	62	864	Garrec et al., 2011
	<i>ampC</i>	F: GGGAATGCTGGATGCACAA R: CATGACCCAGTTCGCCATATC	59	67	Böckelmann et al., 2009)
Tetraciclinas	<i>tetA</i>	F: GCGGTCTTCTTCATCATGC R: CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA	60.9	501	Marti et al., 2013
	<i>tetB</i>	F: CATTAATAGGCGCATCGCTG R: TGAAGGTCATCGATAGCAGG	54.7	930	
Macrólidos	<i>ermA</i>	F: GTTCAAGAACAATCAATACAGAG R: GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	50	421	
	<i>ermB</i>	F: CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC R: GAATCGAGACTTGAGTGTGC	58.4	350	Schmidt et al., 2015
	<i>ermF</i>	F: TCGTTTTACGGGTCAGCACTT R: CAACCAAAGCTGTGTCGTTT	53	182	
Sulfonamidas	<i>sulI</i>	F: GTGACGGTGTTTCGGCATTCT R: TCCGAGAAGGTGATTGCGCT	60.4	779	Marti et al., 2013
Fluroquinolonas	<i>qnrA</i>	F: ATTTCTCACGCCAGGATTTG R: GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	54.5	516	
Polimixinas	<i>mcr-1</i>	F: GCAGCATACTTCTGTGTGGTAC R: TATGCACGCGAAAGAACTGGC	55	309	Chabou et al., 2016
Glicopéptidos	<i>vanB</i>	F: GTGACAAACCGGAGGCGAGGA R: CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA	59.5	433	Talebi et al., 2015

**Tabla 4.** Secuencias de oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento para la detección de elementos móviles genéticos utilizados en este estudio.

Elemento móvil genético	Cebador	Secuencias (F: forward, R: reverse) 5'-3'	Temperatura de alineamiento (°C)	Amplicón (pb)	Referencia
Integrinas	<i>IntI</i>	F: CCTCCCGCACGATGATC R: TCCACGCATCGTCAGGC	56	280	Marti et al., 2013
	<i>IntII</i>	F: TTATTGCTGGGATTAGGC R: ACGGCTACCCTCTGTTATC	51.6	233	
	<i>IntIII</i>	F: AGTGGGTGGCGAATGAGTG R: TGTTCCTGTATCGGCAGGTG	57	600	
Plásmidos	<i>oriV</i>	F: CTCCCGTACTAACTGTCACG R: ATCGACCGAGACAGGCCCTGC	58.3	436	
	<i>oriT</i>	F: TTCGCGCTCGTTGTTCTTCGAGC R: GCCGTTAGGCCAGTTTCTCG	59	191	

La detección de los genes anteriores se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) con la metodología descrita por Marti et al., (2013); la mezcla de reacción consistió de 0.2 U de TaqPolimerasa (BIOLINE, Londres, Inglaterra), 1 X Buffer MyTaq (BIOLINE, Londres, Inglaterra), 2 µl de templado de ADN y 250 nm de cada oligonucleótido con un volumen final de reacción de 20 µl. Las reacciones se realizaron en el termociclador ThermoHybaid (Modelo HBPX110) con un programa que consistió de una desnaturalización a 94°C durante 5 min, 39 ciclos de 94°C por 30 s, seguido de 30 s a la temperatura de alineación de cada gen blanco descritas en la Tabla 2 y 72°C por 30 s y una extensión final a 72°C por 5 min.

Una vez listas las amplificaciones, los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1.5% teñido con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 1X (Biotium, Inc., Hayward, CAL) y utilizando un fotodocumentador con luz UV (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak).

## 6.5 Análisis estadístico

Los análisis para determinar existencia de correlaciones entre cada uno de los genes analizados y el tipo de muestra se realizaron mediante el software RStudio (version 1.0.136; RStudio Team) con los paquetes *gee*, *lme4* y *geepack*, además de las gráficas utilizando el paquete *ggplot2*.

La distribución (%) se obtuvo mediante el conteo total (presencia-ausencia) de los genes analizados en cada una de las muestras.

## 6.6 Evaluación de la capacidad de transformación

### 6.6.1 Condiciones de crecimiento de *Acinetobacter baumannii* A118

*A. baumannii* A118 ATCC BAA-2093 fue cultivada en agar Luria Bertani (LB, US Biological, Salem, MA) o en 5 ml de caldo LB (TM Media, Netaji Subhash Place, Delhi) e incubada a 37°C durante 24 horas.

### 6.6.2 Transformación natural

La adquisición y expresión de los genes de resistencia a antibióticos presentes en el ADN extracelular fueron evaluados utilizando la competencia natural de *A. baumannii* A118 según el protocolo descrito por Domingues et al. (2019). Se utilizó el medio de motilidad compuesto de 0.5% agarosa (BD Bioxon, Franklin Lakes, New Jersey), 5 g/l de peptona de caseína (BD Bioxon, Franklin Lakes, NJ) y 2.5 g/l de NaCl (Jalmek Científica, San Nicolás de los Garza, Nuevo León). Una colonia de la bacteria proveniente de una placa con agar LB almacenada no más de dos semanas a 4 °C, fue suspendida en 20 µl de solución salina de fosfatos 1X (PBS, pH 7.4) estéril y mezclada con 20 µl de ADN (aprox. 4 µg); el medio fue picado siete veces depositando 2 µl de la mezcla de transformación cada vez, la placa fue sellada con Parafilm e incubada a 37°C durante 24 h; las colonias fueron recuperadas de la superficie del medio con un asa bacteriológica estéril y resuspendidas en 1 ml de PBS, seguido de la siembra en agar LB con ampicilina 100 µg/µl para determinar las UFCs transformantes y en agar LB para las UFC receptoras mediante la técnica de extensión en placa y así estimar la frecuencia de transformación. Se realizaron además 6 diluciones decimales seriadas en PBS

para facilitar el conteo, sembrándose 100 µl de cada una en placas con tres divisiones con agar LB y agar con ampicilina 100 µg/µl.

Se utilizó el ADN plasmídico extraído mediante lisis alcalina de la cepa de *Escherichia coli* DH5α transformada con el vector pCR™-TOPO® (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), el cual tiene un marcador de resistencia a ampicilina, además de un inserto de 109 pb que servirá para su detección, como control positivo de donador de ADN. En cada experimento de transformación se agregó como control negativo agua miliQ estéril en lugar del ADN.

Se realizaron tres ensayos independientes de transformación utilizando distintas muestras de ADN (melón, manos y agua) con presencia del gen de ampicilina previamente detectado mediante PCR, cada uno por duplicado.

#### **6.6.3 Frecuencia de transformación**

Las frecuencias de transformación se determinaron comparando las Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) obtenidas en agar LB-Amp (transformantes) y agar LB (receptoras) en cada experimento y su duplicado, dividiendo las UFCs transformantes entre las UFCs receptoras.

#### **6.6.4 Confirmación de transformantes**

Se consideraron como posibles UFCs transformantes las colonias que crecieron en agar LB adicionado con ampicilina 100 µg/µl (10 mg/ml), por lo que se seleccionaron 3 colonias al azar para la detección del amplicón de 109 pb específico para la detección del plásmido control y de 68 pb para la detección del ADN procedente de las muestras utilizadas (primers para el gen *ampC*, Tabla 3).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 GRAs detectados por PCR punto final

Se analizó un total de 201 muestras que provenían del ambiente de producción de melón: agua de riego, melones y manos de pizcadores en huertas localizadas en la región de Paila, Coahuila de Zaragoza tomadas en 3 visitas en el verano de 2017, a las cuales previamente se les había realizado la extracción por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Los filtrados fueron sometidos a una segunda filtración en membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ . A ésta se le realizó la extracción del ADN, el cual fue utilizado para la detección de 19 genes relacionados a la resistencia a diversos grupos de antibióticos y elementos genéticos móviles (Tablas 5 y 6).

**Tabla 5.** Número de muestras (%) que poseían genes relacionados a la resistencia a antibióticos evaluados en este estudio.

Grupo de antibióticos	Genes	Tipo de muestra			Total (n = 201)
		Lavado de melón (n = 100)	Lavado de manos de pizcadores (n = 65)	Agua de riego (n = 36)	
B-lactámicos	<i>blaCARB-4</i>	1 (1 %)	0	0	1 (0.50 %)
	<i>blaOXA-5</i>	0	0	0	0
	<i>blaSHV</i>	0	0	0	0
	<i>blaCTXM-1</i>	0	0	0	0
	<i>ampC</i>	52 (52 %)	38 (58.5 %)	11 (30.6 %)	100 (49.8 %)
Tetraciclinas	<i>tetA</i>	25 (25 %)	20 (30.8 %)	3 (8.3 %)	48 (23.9 %)
	<i>tetB</i>	6 (6 %)	4 (6.2 %)	1 (2.8 %)	11 (5.5 %)
Macrólidos	<i>ermA</i>	14 (14 %)	7 (10.8 %)	11 (30.6 %)	32 (16 %)
	<i>ermB</i>	0	0	0	0
	<i>ermF</i>	5 (5 %)	3 (4.6 %)	0	8 (4 %)
Sulfonamidas	<i>sulI</i>	10 (10 %)	14 (21.5 %)	3 (8.3 %)	27 (13.4 %)
Fluroquinolonas	<i>qnrA</i>	0	0	0	0
Polimixinas	<i>mcr-1</i>	2 (2 %)	9 (13.8 %)	1 (2.8 %)	12 (6 %)
Glicopéptidos	<i>vanB</i>	0	0	1 (2.8 %)	1 (0.50 %)

**Tabla 6.** Número de muestras (%) del ambiente de producción de melón que contenían genes relacionados a elementos móviles evaluados en este estudio.

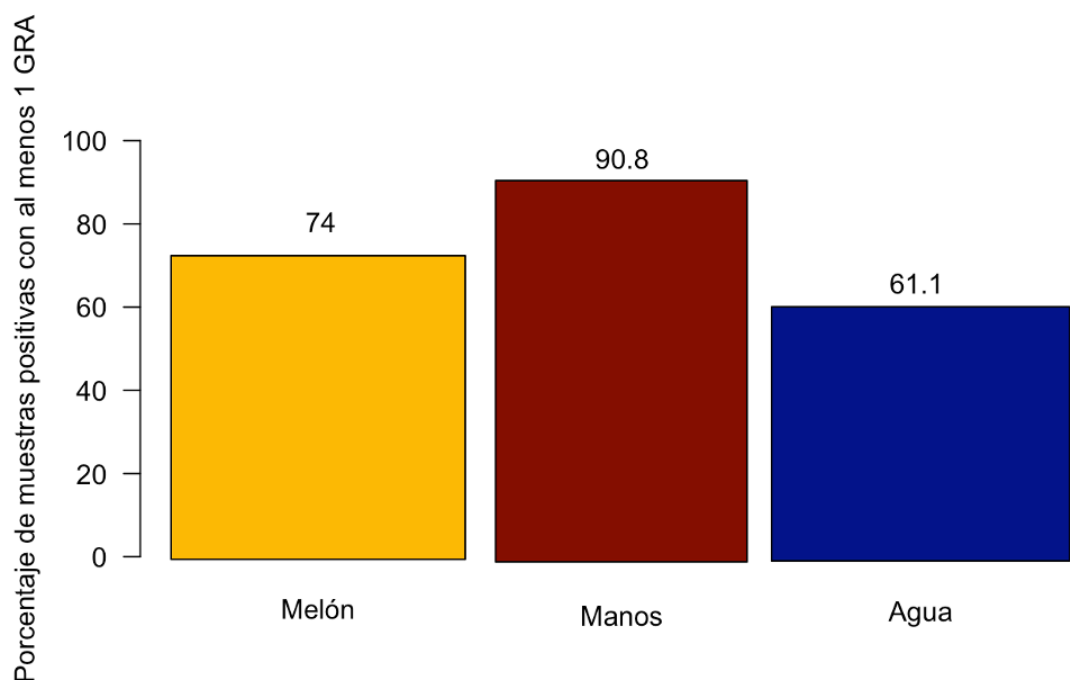
Elemento móvil genético	Genes	Tipo de muestra			Total (n = 201)
		Lavado de melón (n = 100)	Lavado de manos de pizcadores (n = 65)	Agua de riego (n = 36)	
<b>Integrinas</b>	<i>IntI</i>	30 (30 %)	13 (20 %)	5 (13.9 %)	48 (23.9 %)
	<i>IntII</i>	1 (1 %)	7 (10.8 %)	0	8 (4 %)
	<i>IntIII</i>	4 (4 %)	8 (12.3 %)	3 (8.3 %)	15 (7.5 %)
<b>Plásmidos</b>	<i>oriV</i>	4 (4 %)	1 (1.5 %)	4 (11.1 %)	9 (4.5 %)
	<i>oriT</i>	0	0	0	0

Los GRAs con mayor predominancia entre muestras fueron *ampC* (49.8%, 100/201) del grupo de los  $\beta$ -lactámicos, *tetA* (23.9%, 48/201) de las tetraciclinas, *ermA* (16%, 32/201) de la clase de los macrólidos y *sulI* (13.4%, 27/201) de las sulfonamidas (Tabla 5). De entre los elementos móviles analizados, el de mayor porcentaje de muestras positivas fue el gen *intI* (23.9%, 48/201) perteneciente al grupo de las integrinas (Tabla 6).

Las muestras provenientes de lavado de manos de pizcadores son las que mayor número de muestras positivas obtuvieron a cualquiera de los grupos de genes analizados con un 90.8%, seguido de los lavados de melones con 74% y el agua de riego 61.1% (Figura 3).

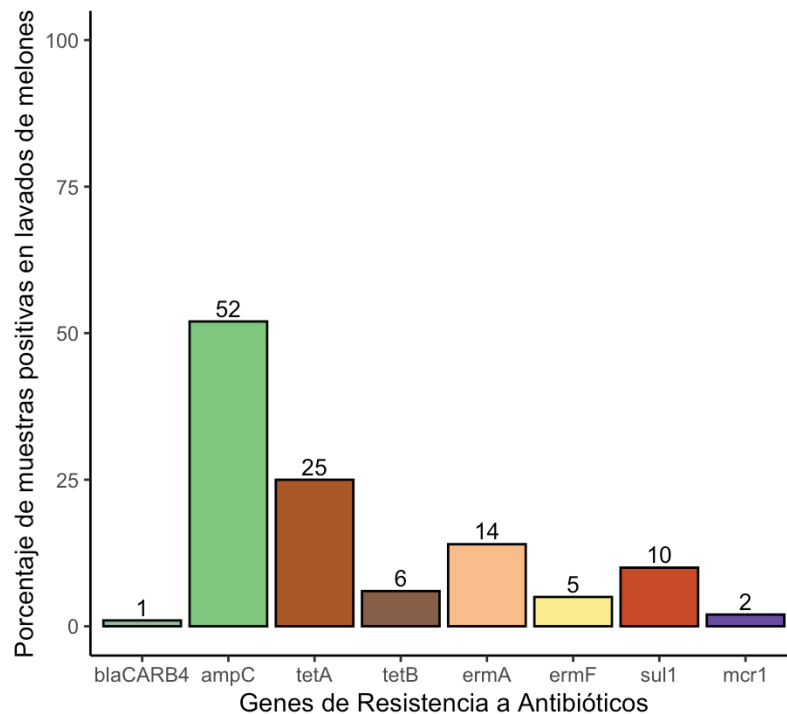
En comparación a los datos anteriores donde se evalúa la presencia de al menos un gen de resistencia, 45 muestras (45%) de los lavados de melones mostraron la presencia de dos o más genes de resistencia a antibióticos y solamente 3 (1%) dos o más genes de movilidad. 41 muestras (63%) de lavados de manos de pizcadores presentaron dos o más genes de resistencia, y solo 1 muestra (1.5%) obtuvo dos genes positivos de movilidad. 8 muestras (22.2%) de agua de riego presentaron dos o más genes positivos de resistencia y solo 1 muestra (2.8%) con dos genes positivos de movilidad.



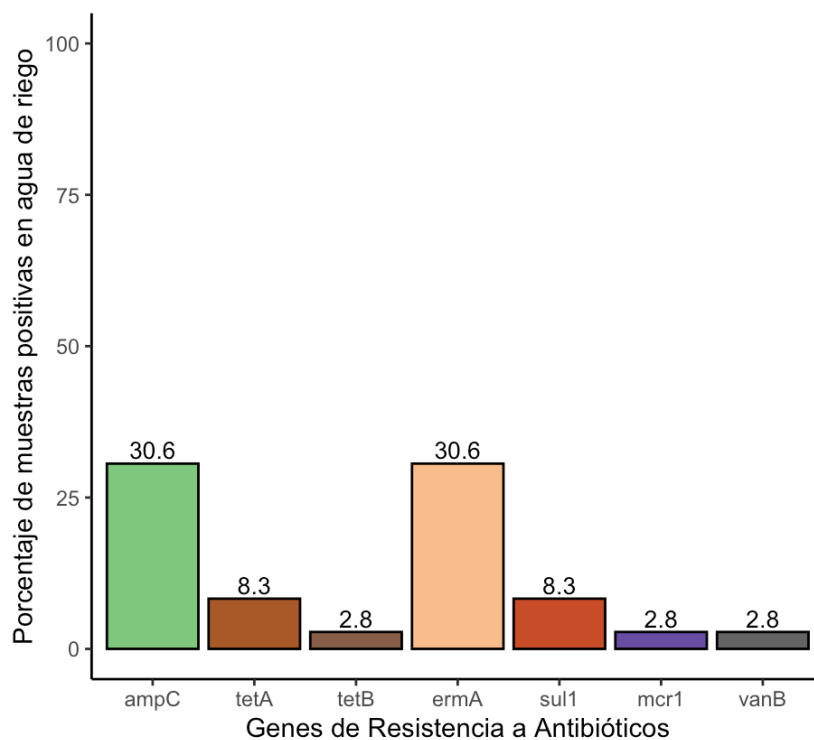


**Figura 3.** Presencia de Genes de Resistencia a Antibióticos en los distintos tipos de muestra. Datos representados en porcentaje (melones, n=100; manos, n=65; agua, n=36).

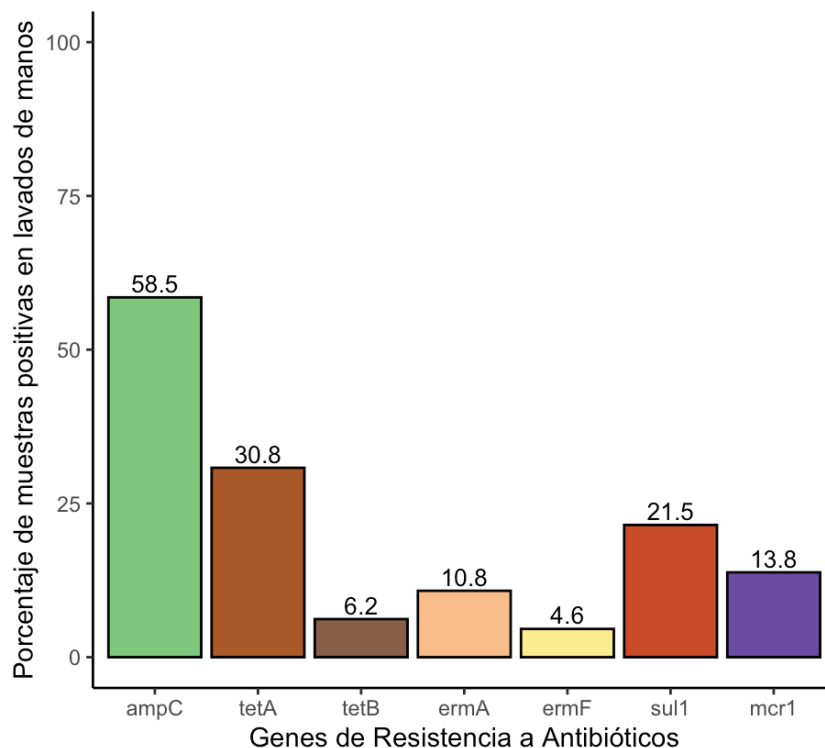
Analizando con respecto al tipo de muestra, se conserva el patrón de presencia predominante de los cuatro genes de resistencia anteriormente destacados (*ampC*, *tetA*, *ermA*, *sulI*) en las muestras de lavados de melones con 52% *ampC*, 25% *tetA*, 14% *ermA* y 10% *sulI* (Figura 4). En agua de riego se encuentran *ampC* y *ermA* con la misma prevalencia de 30.6% y *tetA* y *sul* con 8.3% cada uno (Figura 5). Los lavados de manos de pizcadores presentaron un gen distinto a los cuatro anteriores, *mcr-I* del grupo de las polimixinas, con un mayor número de muestras positivas (9, 13.8%) que *ermA* (7, 10.8%), seguido de *sulI* con 21.5%, *tetA* con 30.8% y *ampC* con 58.5% (Figura 6).



**Figura 4.** Presencia de Genes de Resistencia a Antibióticos en lavados de melones. Solo se muestran los genes en los que se obtuvieron muestras positivas. Datos representados en porcentaje (n=100).

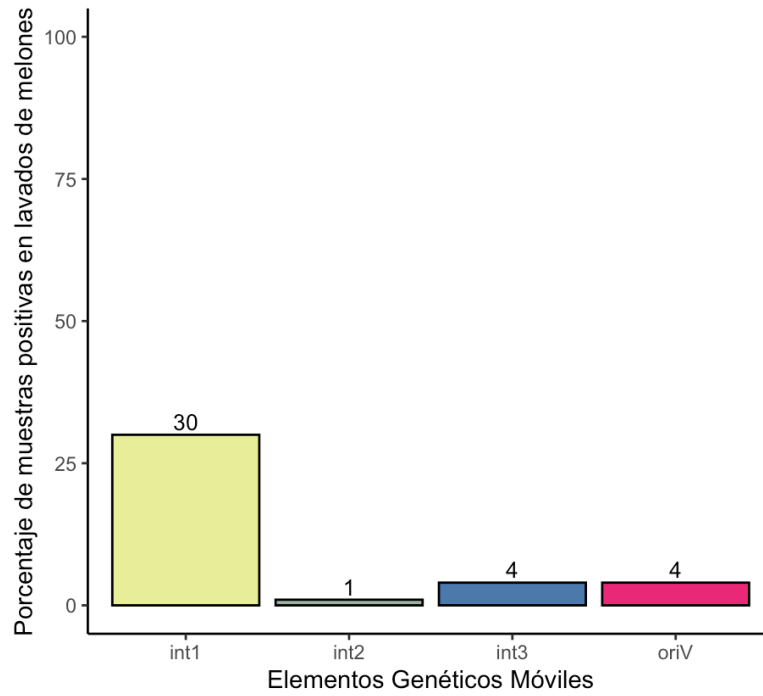


**Figura 5.** Presencia de Genes de Resistencia a Antibióticos en agua de riego. Solo se muestran los genes en los que se obtuvieron muestras positivas. Datos representados en porcentaje (n=36).

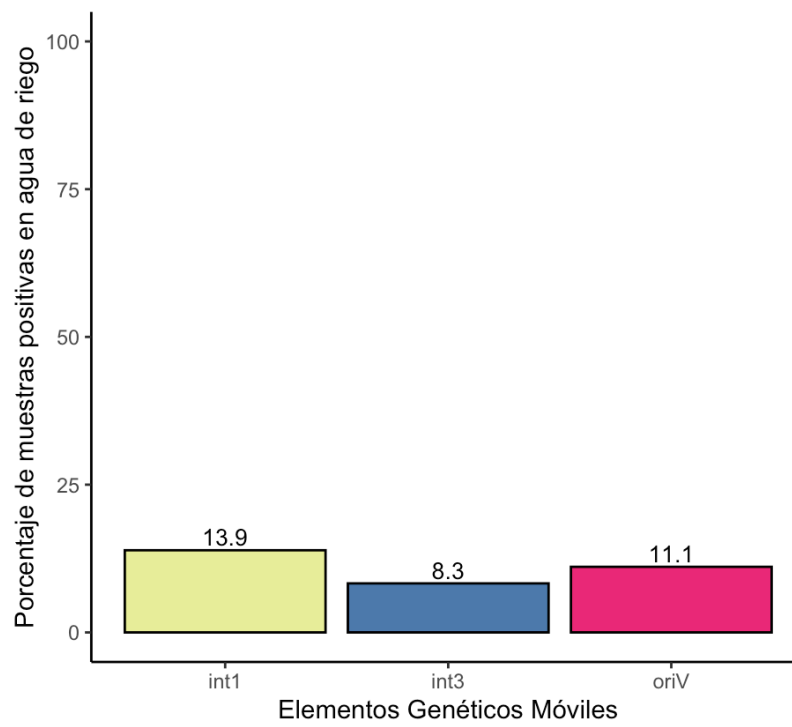


**Figura 6.** Presencia de Genes de Resistencia a Antibióticos en lavados de manos de pizzadores. Solo se muestran los genes en los que se obtuvieron muestras positivas. Datos representados en porcentaje (n=65).

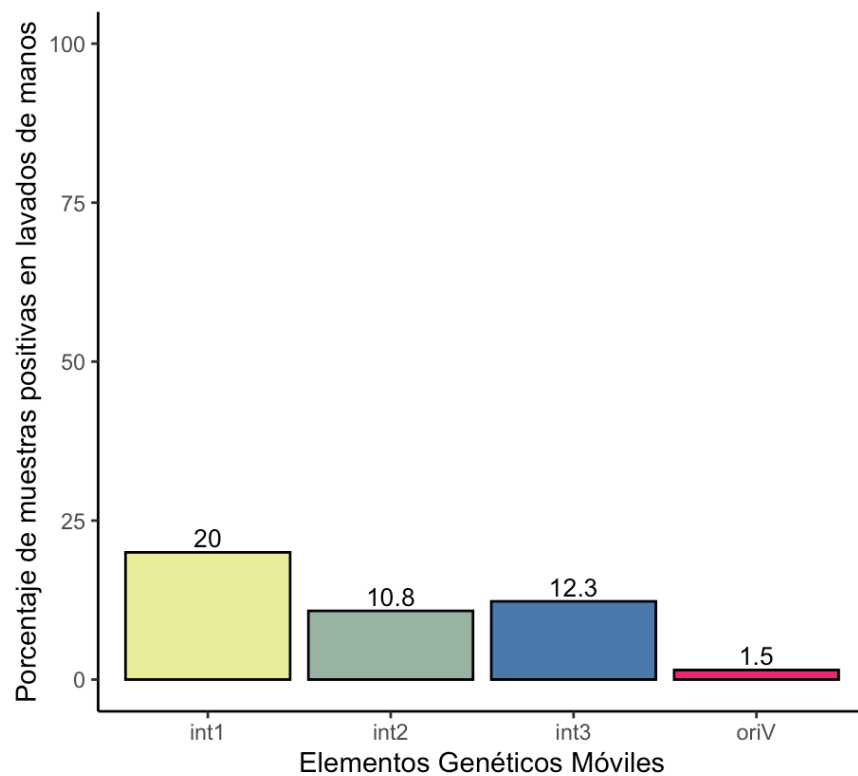
La predominancia de *int1* se conserva en los tres distintos tipos de muestra, con 30% de muestras positivas para los lavados de melones, 13.9% para el agua de riego y 20% para los lavados de manos de pizzadores, además de la presencia en menor cantidad de *int3* y *oriV*, y la ausencia de *oriT*. Los lavados de melones tuvieron la misma cantidad de *int3* y *oriV* (4%) y muy baja prevalencia de *int2* (1%) (Figura 7), las muestras de agua de riego sólo presentaron dos genes positivos además de *int1*, *int3* (8.3%) y *oriV* (11.1%), siendo el tipo de muestra donde se encontró la mayor cantidad de positivos para *oriV* de todo el estudio (Figura 8), por último, las muestras de lavados de manos tuvieron mayor presencia de *int3* (12.3%), seguido de *int2* (10.8%) y *oriV* (1.5%) (Figura 9).



**Figura 7.** Presencia de Elementos Genéticos Móviles en lavados de melones. Solo se muestran los genes en los que se obtuvieron muestras positivas. Datos representados en porcentaje (n=100).



**Figura 8.** Presencia de Elementos Genéticos Móviles en agua de riego. Solo se muestran los genes en los que se obtuvieron muestras positivas. Datos representados en porcentaje (n=36).



**Figura 9.** Presencia de Elementos Genéticos Móviles en lavados de manos. Solo se muestran los genes en los que se obtuvieron muestras positivas. Datos representados en porcentaje (n=65).

### 7.1.1 Análisis estadístico en R

Aplicando regresión logística se encontró que existe una asociación significativa entre la presencia de cualquiera de los genes y los lavados de manos, utilizando como grupo de referencia a los lavados de los melones (RM: 5.365 95%, IC: 1.675-17.19) (Tabla 7), significando que existe mayor probabilidad de encontrar un gen en muestras de manos de pizcadores que en lavados de melones.

**Tabla 7.** Análisis obtenido en R para la regresión logística entre presencia de cualquier gen (movilidad y resistencia) y muestras.

	Estimado	Error estándar	Wald	Sig.	Intervalos de confianza 95%		Razón de Momios (RM)
					Menor	Mayor	
<b>Intercepto</b>	1.377	0.422	10.63	0.0011*	1.731	9.06	3.961
<b>Manos</b>	1.68	0.594	8	0.0047*	1.675	17.19	5.365
<b>Agua</b>	-0.421	0.954	0.19	0.6591	0.101	4.26	0.656

\* = Asociación significativa

Al analizar por separado las dos clases de genes (movilidad y resistencia), la tendencia anteriormente descrita se cumplió de igual manera. Existe una asociación significativa entre la presencia de cualquier gen de resistencia y los lavados de manos de pizcadores (RM: 3.464 95%, IC: 0.996-12.05) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Análisis obtenido en R para la regresión logística entre presencia de genes de resistencia a antibióticos y muestras.

	Estimado	Error estándar	Wald	Sig.	Intervalos de confianza 95%		Razón de Momios (RM)
					Menor	Mayor	
<b>Intercepto</b>	1.044	0.437	5.71	0.017*	1.206	6.69	2.841
<b>Manos</b>	1.242	0.636	3.81	0.050*	0.996	12.05	3.464
<b>Agua</b>	-0.592	0.809	0.54	0.464	0.113	2.7	0.553

\* = Asociación significativa

De la misma manera, existe asociación significativa entre la detección de genes de movilidad y los lavados de manos, con referencia a los lavados de los melones (RM: 1.42 95%, IC: 1.116-1.81) (Tabla 9).

**Tabla 9.** Análisis obtenido en R para la regresión logística entre presencia de elementos genéticos móviles y muestras.

	Estimado	Error estándar	Wald	Sig.	Intervalos de confianza 95%		Razón de Momios (RM)
					Menor	Mayor	
<b>Intercepto</b>	-0.597	0.273	4.79	0.0287*	0.322	0.94	0.55
<b>Manos</b>	0.352	0.123	8,12	0.0044*	1.116	1.81	1.42
<b>Agua</b>	-0.224	0.452	0.24	0.6212	0.329	1.94	0.8

\* = Asociación significativa

Sin embargo, no se encontró asociación significativa cuando se analizó la relación de cualquiera de los grupos de genes con las muestras de agua de riego.

## 7.2 Capacidad de transformación por GRAs observada

Se evaluó la frecuencia de transformación de *A. baumannii* A118 dividiendo las UFCs transformantes entre las UFCs receptoras obtenidas de sembrar la bacteria transformada en placas LB con y sin antibiótico, para obtener los datos de la Tabla 10. Tanto para receptoras como transformantes se reporta el promedio de duplicado de experimentos.

Se utilizó como ADN transformante, además del plásmido control con resistencia a ampicilina como control, tres muestras distintas, cada una perteneciente a un tipo de muestra diferente (manos, melones y agua).

De cada experimento se realizó una posterior PCR de *ampC* de 3 colonias transformadas elegidas al azar para confirmar que la resistencia estuviera presente en *A. baumannii* mostrando siempre resultados positivos.

Para los lavados de melones y agua de riego, se encontraron transformantes de  $1.3 \times 10^3$  UFCs y  $2.1 \times 10^3$  UFCs, respectivamente, de lavado de manos fue de 800 UFCs. Los valores bacterias receptoras se mantuvieron constantes con los tres tipos de muestra  $10^9$  UFCs. Las frecuencias de transformación se conservaron también en los tres distintos tipos de muestra con  $10^{-7}$  UFCs.

**Tabla 10.** Frecuencias de transformación obtenidas de acuerdo al ADN transformante en *Acinetobacter baumannii* A118.

ADN transformante	Transformantes (UFCs/placa)	Receptoras (UFCs totales)	Frecuencias de transformación
ADN control Plásmido TOPO-TA modificado que confiere resistencia a ampicilina	$2.6 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^4$	$1.9 \times 10^9 \pm 3.3 \times 10^8$	$1.4 \times 10^{-5}$
Lavados de melones: M18*	$1.3 \times 10^3 \pm 707$	$1.6 \times 10^9 \pm 1.3 \times 10^9$	$8.1 \times 10^{-7}$
Lavados de manos de pizcadores: T1*	$800 \pm 141$	$1.6 \times 10^9 \pm 1.3 \times 10^9$	$5 \times 10^{-7}$
Agua de riego: B2*	$2.1 \times 10^3 \pm 781$	$2.3 \times 10^9 \pm 1.9 \times 10^9$	$9.1 \times 10^{-7}$

\* M18, T1 y B2 se refieren al etiquetado de muestra dado durante el proyecto



## 8. DISCUSIÓN

En este estudio se realizó la detección de 19 genes relacionados a resistencia a diversos grupos de antibióticos y elementos de movilidad genética dentro del ambiente de producción del melón, específicamente en el ADNex, de huertas en Paila, Coahuila de Zaragoza.

Se ha reportado previamente la presencia de una amplia lista de estos mismos tipos de genes de resistencia en productos de huertas de zanahorias, rábanos, lechuga, pepino, tomate y chile en la ciudad de Londres, Ontario, Canadá, con la diferencia de que sus análisis fueron realizados en ADN<sub>i</sub> (Marti et al., 2013). De manera general, los GRAs, que también fueron analizados en nuestro trabajo, con mayor presencia entre sus muestras fueron *sull*, *tetA*, *blaCTX-M*, *ermB* y de movilidad *oriV*. Al igual que en lo visto en los resultados de este trabajo, *sull* y *tetA* son algunos de los genes que mayor número de muestras positivas mostraron, sin embargo, al contrario de lo observado por Marti y colaboradores, los genes *blaCTX-M*, *ermB* y *oriV* no tuvieron ningún resultado positivo.

Existe una alta prevalencia de genes relacionados a la resistencia a tetraciclina en las comunidades microbianas asociadas a distintos vegetales (Rodríguez et al., 2006). Rodríguez y colaboradores reportaron la presencia de *tetB* y *tetC* en todas sus muestras (n=10), comúnmente acompañados estos con la presencia de *tetA* pero en menor proporción. En la presente investigación, *tetA* (48 positivos, 23.9 %) tuvo una proporción de poco más de cuatro veces más muestras positivas en comparación con las de *tetB* (11, 5.5 %), mientras que *tetC* no fue evaluado.

Es ampliamente conocido que el suelo es un reservorio importante de GRAs con o sin tratamiento de fertilizantes que pueden ser transferidos a los vegetales directamente durante su cultivo (Gorni et al., 2015; Leff & Fierer, 2013), por lo que son numerosos los estudios que buscan ADN extracelular o intracelular en este tipo de muestras (McKinney et al., 2018). Cadena et al. (2018) buscaron la presencia de genes de resistencia a tetraciclina en muestras de suelo de distintas huertas y vegetales (n=196) como maíz, soya, alfalfa, trigo, cebada, rábano, nabo, entre otros, y donde se encontró luego de un análisis de 29 genes codificantes a esta resistencia, que los más frecuentemente detectados fueron *tetG* (55 %), *tetQ* (49 %), *tetS* (46 %), *tetX* (30 %) y *tetA* (29 %) (Cadena et al., 2018). A pesar de estar en la quinta

posición de detección de entre los 29 genes, *tetA* sigue siendo notorio al tener 57 muestras positivas. Sin embargo, es difícil comparar de manera directa con este trabajo debido a que la procedencia de las muestras es distinta, al no ser de vegetales o lavados de estos. Lo rescatable es sin duda como los numerosos genes de resistencia a tetraciclina están presentes en el ambiente de producción de muchos vegetales.

Es importante analizar de manera general la presencia de GRAs en el ambiente, enfocándonos en ciertos miembros, como en nuestro trabajo, para crear un panorama general de la situación de contaminación por GRAs en diversos ambientes. En el trabajo publicado por McKinney et al. (2018) hacen un análisis de 220 muestras de suelo buscando la presencia de diversos genes, encontrando 146 muestras positivas de *int1*, 4 de *blaCTX-M-1*, 15 de *ermB*, 176 de *sul1*, 0 de *tetA*, 128 de *tetW* y 59 de *tetX* (McKinney et al., 2018). Al contrario de lo observado en este trabajo con solo 27 muestras positivas para *sul1* de 201 (13.4 %), 0 muestras positivas de *ermB* y 48 de *tetA* (23.9 %), McKinney et al reportaron 80% de positivos de *sul1*, 6.8 % de *ermB* y 0 de *tetA*. Una limitante estipulada por ellos durante su estudio fue que el método de qPCR utilizado para la detección de los genes antes mencionados no puede diferenciar entre genes presentes en el ADN<sub>i</sub> o el ADN<sub>ex</sub>, si el ADN viene de bacterias vivas o muertas o determinar qué bacteria carga cuál gen y si es que estos genes son expresados. La remoción de bacterias utilizando una membrana de 0.45  $\mu$ m ha sido demostrado en numerosas referencias (Hasegawa et al., 2003; Marti et al., 2013; Onyango et al., 2010), como un procedimiento exitoso realizado previo al análisis del ADN<sub>ex</sub> en las muestras de este trabajo.

De entre los grupos importantes de resistencia a antibióticos se encuentran  $\beta$ -lactamasas, cuyos miembros han sido ampliamente encontrados en el pasado. En un estudio por Raphael et al. 2011, que se enfocaba en la búsqueda de secuencias de genes de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido en bacterias en espinacas orgánicas y no orgánicas se obtuvieron 12 aislados pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Serratia* y *Pantoea*, quienes mostraron resistencia a múltiples antibióticos. De entre estos 12 aislados, 10 resultaron positivos para la amplificación del gen *blaCTX-M* (Raphael et al., 2011). Sin embargo, en el análisis de ADN<sub>i</sub> de las mismas muestras del presente trabajo (datos no mostrados), no se obtuvo

ninguna muestra positiva, por lo que no encontrarlos en el ADN extracelular concuerda con los reportes previos.

La presencia de genes relacionados con la resistencia al antibiótico sulfonamida son ampliamente reportados, en especial *sul1*, *sul2* y *sul3*. En un trabajo publicado por Blau et al. (2018) donde se estudió la presencia de varios genes asociados a la resistencia antimicrobiana como *tetA*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *blaTEM*, *blaCTX-M-1*, *blaSHV*, *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*. De 63 aislados, un total de 10 fueron positivos para *sul1* (15.9%), 14 para *sul2* (22.2%) y 5 para *sul3* (8%). La combinación de *sul1-sul2* fue detectada en 7 aislados, *sul2-sul3* en 3 y *sul1-sul3* solamente en 1. El porcentaje de positivos reportado previamente para *sul1* es muy parecido a lo encontrado en el presente trabajo, sin embargo con la diferencia de que no fueron de cepas aisladas. Además, la búsqueda de una posible correlación entre más genes del grupo de resistencia a sulfonamidas podría ser interesante de realizar en el futuro. Los genes *qnrB* y *qnrS*, codificantes para la resistencia a fluoroquinolonas fueron detectados solos o en combinación en 1 aislado para *qnrB* y 38 para *qnrS*, respectivamente, mientras que *qnrA* no fue detectado, concordando con nuestros resultados. El gen *blaTEM* fue detectado en 82.5% aislados, mientras que no fueron obtenidos muestras positivas en este trabajo. Y al igual que en nuestro trabajo, el gen *blaSHV* no fue detectado (Blau et al., 2018).

La colistina a pesar de ser un antibiótico con uso limitado para tratar infecciones severas causadas por bacterias Gram-negativas debido a la toxicidad en humanos, se han encontrado plásmidos que contienen el gen *mcr-1* en distintos ambientes. En un estudio realizado en California por Mavrici et al (2017), buscaron en aislados de *E. coli* STEC y no-O157 relacionados a vegetales de hoja, frutas y otros vegetales con un total de 240 muestras, los genes *mcr-1* y *mcr-2*. Los resultados obtenidos mediante qPCR mostraron que todos los 240 aislados colectados fueron negativos para los dos genes *mcr*, lo que fue confirmado por PCR convencional (Mavrici et al., 2017). Estos resultados sugieren baja probabilidad de ocurrencia de genes relacionados a resistencia a colistina en vegetales. Sin embargo, en este estudio se presentaron 12 muestras positivas (6%) teniendo el mayor número en lavados de manos de pizcadores (9, 4.5 %).

Al contrario de lo anterior revisado, Oh et al (2020) reportaron el análisis de 1324 vegetales frescos (879 con hojas, 236 frutas, 170 tallos, 37 raíces y otras 2 verduras) y 150 muestras de

heces fecales de animales sanos (pollos, cerdos y ganado), todos de Corea del Sur. De los vegetales, se recuperó solamente 1 aislado y 6 de las heces (4 de cerdo y 2 de pollo) de *E. coli* resistente a colistina (confirmados mediante pruebas de susceptibilidad) por PCR, todos obtuvieron la amplificación del gen *mcr-1*. En el trabajo, se analizó la posibilidad de transmisión directa a humanos a través de la cadena alimentaria de este gen debido a que en Corea del Sur es común que se reutilice fertilizante orgánico de granjas en huertas (Oh et al., 2020).

En un estudio metagenómico realizado para determinar el impacto de uso de agua residual como riego en agricultura en la capacidad el desarrollo de resistencia bacteriana en suelo. Las muestras de suelo se colectaron en dos países africanos de tres diferentes ciudades. Luego del análisis de las poblaciones bacterianas en suelos con y sin irrigación con agua residual, identificaron la presencia de genes  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido en ambos tipos de suelo como *blaCARB-3*, *blaOXA-347*, *blaOXA-5* y *blaRM3*. Atribuyen la alta presencia de estos genes (y en general de esta clase) a que son principalmente encontrados en bacterias Gram-negativas, quienes sobreviven en suelos que son fertilizados provocando su crecimiento y la diseminación de GRAs, permitiendo de esta manera o que estos puedan tener contacto con humanos o animales de forma directa o a través de la cadena alimentaria (Bougnom et al., 2019). Al contrario de lo observado en la sección de resultados, no se encontró el gen *blaOXA-5* presente en el ADN extracelular en ningún tipo de muestra, además del gen *blaCARB-4* también perteneciente a la misma familia de  $\beta$ -lactamasas.

La importancia del análisis de GRAs en vegetales no solo recae en el producto de consumo final, sino en el manejo durante la pre-cosecha, incluyendo el suelo y el fertilizante que se utilice en los campos. En el trabajo publicado por Rahube et al (2014) se enfocaron en la búsqueda de GRAs asociados a bacterias patógenas en vegetales y suelo de hortalizas como lechuga, zanahorias, rábanos, pepinos y tomates, las cuales estaban fertilizadas de forma inorgánica o con lodos de aguas residuales municipales sin tratar. Fueron numerosos los genes evaluados mediante qPCR los cuales resultaron ser considerablemente más abundantes en vegetales cosechados en parcelas tratadas con lodos. En tomate se detectaron genes como *oriT*, *ermB*, *in1*, *sull*; en lechuga *oriT*, *tetA*, *sull*, *ermB*, *blaCTX-M-1*; en zanahoria *oriT*, *oriV*, *sull*, *tetA*, *ermB*, *int3*; en rábano *oriT*, *oriV*, *int1*, *tetA*, *sull*; en pepino *ermB*, *sull*, todos

genes encontrados también en este trabajo. Además de estos genes, encontraron otros como *qnrB*, *qnrS*, *blaOXA-1*, *blaOXA-2*, *vanC*, los cuales no fueron analizados en este trabajo, sin embargo otros de estas mismas familias (*qnrA*, *blaOXA-5* y *vanB*) sí fueron buscados sin encontrar ninguna muestra positiva, factor que pudo ser diferente de haber incluido genes como los anteriores ya previamente asociados a vegetales (Rahube et al., 2014). Cabe destacar que es necesario conocer el procedimiento de fertilización que se le da a los huertos, sin embargo, se da un claro indicio que puede ser un factor importante que afecta la presencia de GRAs en la cosecha de los cultivos.

Son muy pocos los artículos que realizan la búsqueda de GRAs en ADNex y en su totalidad los buscan en zonas muy específicas y en ecosistemas acuáticos o en sedimentos. Un ejemplo es el trabajo publicado por Dong et al (2019) donde analizan 10 GRAs (*sul1*, *sul2*, *tetW*, *tetX*, *ermA*, *ermB*, *blaTEM*, *ampC*, *cat* y *cmr*) y el integron clase I (*int1*) en muestras provenientes de lodos de hospital, industria farmacéutica, planta de tratamiento de aguas residuales, estiércol porcino y sedimento del lago urbano en forma de ADNex y ADNi mediante qPCR. Encontraron la presencia de los diez genes e *int1* en ADNex y ADNi todos en concentraciones mayores de  $10^{-6}$  número de copias. Aunque en la mayoría de las muestras la concentración de GRAs en ADNex fue menor que la de ADNi, hubo algunos casos como la concentración de *int1*, *sul1*, *tetW* y *cat* en el ADNex del lodo del hospital y *ermA* en el ADNex del sedimento del lago fue mayor que los GRAs en el ADNi (Dong et al., 2019). Otro ejemplo es reportado donde también se encontró una mayor abundancia de GRAs en ADNex que el encontrado en ADNi en áreas costeras de la Bahía Bohai en China (Zhang et al., 2018). Ambos trabajos sugieren que el ADNex es un reservorio potencial de GRAs en distintos ecosistemas, y que existe la posibilidad de propagación de los mismos en el ambiente por los distintos mecanismos de THG.

La utilización de genes que son distintos a los de resistencia a antibióticos son también usados como un indicador de la contaminación GRAs debido a que se relacionan con estos, al encontrarse junto a ellos dentro del genoma de distintas bacterias comensales y patógenas, ayudándoles a diseminarse entre microorganismos de distintos ambientes. Ejemplos de estos son *int1*, *int2*, *int3*, *oriV* y *oriT*. (McKinney et al., 2018). En un trabajo realizado por Lin et al (2015), buscaron genes de resistencia a sulfonamidas, tetraciclina e *int1* en sedimentos de

área costera de China (n=13). Observaron una buena relación entre los genes *int1* y *sul1*, implicando que el *int1* es esencial para la proliferación de *sul1*, además de determinar que *int1* provenía de fuentes externas de contaminación y no de las poblaciones bacterianas dentro de los sedimentos (Lin et al., 2015). Los mismos resultados han sido observado recientemente donde la propagación de *sul1* es facilitada por *int1* en comparación a otros EGMs como *int2* o *int3*. Esta misma relación fue encontrada con otros GRAs como *tetA*, *tetD*, *tetE*, *tetO*, *sul2*, *blaTEM* e incluso algunos metales (Ohore et al., 2018).

La búsqueda de otros genes de integrasas como *int2* e *int3* en conjunto con *int1* han sido realizadas en otros trabajos. En el trabajo publicado por Ndi y Barton (2011), se buscó mediante PCR en 90 aislados de *Aeromonas* los genes *int1*, *int2* e *int3*, *aadA*, *sul1* y *qacI* asociados a integrón, genes de resistencia a  $\beta$ -lactamasa *blaTEM* y *blaSHV*, y genes de resistencia a tetraciclina, *tetA-E* y *tetM*. Se detectó *int1* en 28/90 (31%) de los aislados, al contrario de *int2* e *int3* en ninguno, mientras que *sul1* en 13/15 (86.7%) cepas resistentes a sulfonamida (Ndi & Barton, 2011). En nuestro trabajo sí se encontraron las clases 2 y 3 en menor cantidad, 8 (4%) y 15 (7.5 %), respectivamente, lo que podría significar un papel menor en la THG en el ambiente de producción de melón a nivel pre-cosecha y pos-cosecha.

Los resultados obtenidos en cada uno de los trabajos mencionados anteriormente son consistentes con este y con otros estudios que han detectado bacterias o ADN libre que presentaban distintos GRAs y/o EGMs en productos vegetales a nivel de cosecha e incluso venta, además de los que manejan ADNex encontrado en ecosistemas acuáticos o plantas tratadoras de residuos. Sin embargo, la variación en los objetivos del trabajo, los métodos de laboratorio, la estrategia de muestreo, el tipo de muestra, el vegetal utilizado, la zona geográfica y las prácticas para el manejo de los productos dificultan la comparación directa de los estudios, al menos a nivel cuantitativo. En cambio, como se ha revisado, se conservan a nivel cualitativo la presencia de GRAs entre las investigaciones y numerosos tipos de muestras distintas utilizadas en cada una, demostrando su existencia tanto en ADNi como ADNex y resaltando de manera significativa su importancia en diferentes ecosistemas y la posible transferencia de estos genes entre bacterias.

Además de la detección de los 19 genes, se realizó la transformación natural de *A. baumannii* A118 con ADN de muestras positivas para *ampC* y poder conocer si este ADNex es funcional y capaz de generar resistencia en la bacteria.

*A. baumannii* A118 se está convirtiendo en un excelente modelo para el análisis de transformación natural que realizan un vasto número de bacterias en el ambiente, sin embargo, la mayoría de los estudios se han realizado en *A. baylyi* cepa ADP1, una bacteria que no es tan peligrosa como *A. baumannii*. Se ha demostrado en el pasado que *A. baumannii* A118, así como otras cepas de esta misma especie, son capaces de adquirir ADN exógeno mediante el mecanismo de transformación natural, el cual aún no es bien conocido (Ramirez et al., 2010; German M. Traglia et al., 2019; German Matias Traglia et al., 2016; Wilharm et al., 2013). Domingues et al (2019) encontraron que la competencia para realizar transformación natural de la cepa A118 es inducida dependiendo la composición del medio, donde ellos utilizaron medio semisólido para obtener frecuencias de  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$  al igual que este trabajo con ADN transformante el plásmido control (Domingues et al., 2019), en comparación con otros trabajos que utilizan medio líquido donde las frecuencias fueron menores (Hu et al., 2019; Utnes et al., 2015). Wilharm et al (2013) con el mismo método de Domingues encontraron frecuencias de transformación de estaban en los rangos de  $3 \times 10^{-3}$  a  $6 \times 10^{-8}$ , y concluyeron que la bacteria toma de manera más eficiente ADNex de su entorno si es capaz de moverse en él, ya que la maquinaria de competencia y motilidad están altamente relacionadas (genes *comEC* y *pilT*, respectivamente) (Wilharm et al., 2013). Los resultados del presente trabajo, tanto como el ADN control y el de las muestras, caen dentro de los rangos mencionados obtenidos de transformaciones semisólidas, sin embargo, el ADN utilizado en todos los trabajos ya publicados que buscan estudiar la transformación natural es ADN plásmidico puro, el cual solo se tenía en el control, ya que se desconoce la calidad y nivel de fragmentación del ADN de las muestras provenientes del ambiente del melón.

La plasticidad del genoma de *A. baumannii* es otro problema particular para la toma de ADN exógeno. Esta bacteria tiene la capacidad de recombinar material genético con mejores frecuencias de transformación si este tiene alguna homología con la cepa en específico. Muchos de los trabajos publicados en ADP1 y A118 utilizan ADN con homología para lograr las transformaciones (Domingues et al., 2012, 2019; Overballe-Petersen et al., 2013; German

M. Traglia et al., 2019), en comparación a *Pseudomonas aeruginosa*, quien tiene un extraordinario nivel de plasticidad y diversidad en su genoma, además de ser una bacteria que también puede realizar transformación natural al aceptar ADNex de *biofilms* (Nolan et al., 2019). Sin embargo, se han reportado altos niveles de plasticidad para *A. baumannii*, al tomar ADN de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (La et al., 2014; Leski et al., 2013), por lo que podría ser una razón que en este trabajo se logró la transformación con ADNex de muestras problemas ya que un análisis metagenómico realizado a ADN intracelular de bacterias presentes en las muestras, arrojó que de las bacterias principales pertenecen a esta misma familia e incluso del género *Acinetobacter* (datos no publicados).

Adicionalmente, se realizó la transformación del ADN control en medio líquido (datos no mostrados), sin embargo, utilizando las muestras tanto de lavados de manos como melones, y agua de riego como ADN transformante, no se obtuvo ninguna colonia creciendo en medio con antibiótico. Se cree que la concentración no fue suficiente para realizar una transformación de este tipo ya que las muestras no tenían más de 10ng cada una y se han reportado concentraciones mucho más altas (mínimo 250 ng) necesarias para su éxito (Hu et al., 2019).

Otro método conocido como transformación tipo *puddle*, en donde se utiliza un filtro en el que sobre él crecen las bacterias y el ADN transformante en conjunto, también fue realizada (datos no mostrados) con el control generando colonias resistentes a ampicilina, sin embargo, esto no ocurrió con el ADN de las muestras problema. El fracaso de esta técnica con las muestras podría ser la calidad del ADN (se desconoce si está fragmentado o completo) y la concentración del material genético en las muestras, sin embargo, en el protocolo establecido se utiliza una membrana de 0.025  $\mu\text{m}$  y en nuestro trabajo se realizó con una de 0.22  $\mu\text{m}$ , siendo una vital diferencia que pudo haber logrado la transformación de las muestras. El poro de la membrana debe ser lo más pequeño posible para que permita la interacción del ADN y el cultivo de manera eficaz, si además de un poro mayor agregamos una concentración menor de ADN, es posible que el método no funcione.

Un trabajo por Overballe-Petersen et al (2013), describió la toma mediante transformación natural de *A. baylyi* ADP1 de ADN fragmentado y dañado previamente, para determinar si aún podría generar algún cambio en el material genético de la bacteria. A pesar de que este



tipo de ADN es principalmente fuente de nutrientes para las bacterias, ellos demostraron que material genético menor a 20 pb puede ser capaz de ser adquirido por *A. baylyi* ADP1 y recombinado dentro de su genoma para generar variaciones nucleotídicas. Estas variaciones ocasionadas por la absorción de fragmentos cortos de ADN escapan a la reparación tipo *mismatch* generando polimorfismos y variabilidad genética dentro de especies naturalmente transformables (Overballe-Petersen et al., 2013). Esto podría significar que además de los plásmidos con resistencia, exista ADN altamente fragmentado en las muestras de este trabajo que ocasione cambios en el genoma que no sean vistos en su morfología y fisiología como la adquisición de resistencia a un antibiótico, sin embargo, estudios en la bacteria *A. baumannii* aún son necesarios. No obstante, un análisis más exhaustivo de la nueva cepa resistente es imprescindible.

## 9. CONCLUSIONES

1. Se encontró la presencia de genes en ADN extracelular relacionados a la resistencia a antibióticos y movilidad genética en muestras de agua de riego, suelo lavados de melones y de manos de pizcadores en huertas de melón.
2. Los genes de resistencia *ampC*, *tetA* y de movilidad *int1* fueron los tres genes con mayor número de muestras positivas con 100 (49.8%), 48 (23.9%) y 48 (23.9%), respectivamente.
3. No se encontró ninguna muestra positiva para 6 genes *blaOXA-5*, *blaCTX-M-1*, *blaSHV*, del grupo de los genes de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, *ermB* del grupo de los macrólidos, *qnrA* de las fluoroquinolonas y *oriT* de los plásmidos como elementos de transferencia genética y con muy baja frecuencia *blaCARB-4* de B-lactámicos y *vanB* de los glicopéptidos.
4. Se encontró en 45 muestras (45%) de los lavados de melones la presencia de dos o más genes de resistencia a antibióticos y solamente 3 muestras (3%) dos o más genes de movilidad. En lavados de manos, 41 muestras (63%) presentaron dos o más genes de resistencia, y solo 1 muestra (1.5%) obtuvo dos genes positivos de movilidad. Mientras que 8 muestras (22.2%) de agua de riego presentaron dos o más genes positivos de resistencia y solo 1 muestra (2.8%) dos genes positivos de movilidad.
5. Existe una asociación significativa entre la presencia de cualquiera de los genes y los lavados de manos, cuando se comparó con las muestras de los lavados de los melones.
6. El ADN<sub>ex</sub> presente en las muestras de lavados de melones, manos y agua de riego es capaz de transformar de manera natural la cepa de *Acinetobacter baumannii* A118 con frecuencias de transformación de  $8.1 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$  y  $9.1 \times 10^{-7}$  respectivamente, otorgándole la capacidad de generar resistencia a ampicilina.

## 9. PERSPECTIVAS

Gracias a los resultados obtenidos en este trabajo, se suscitaron otras preguntas del mismo. Sería de particular interés analizar la procedencia de los genes que se obtuvieron en el ADNex mediante un análisis metagenómico o una secuenciación para poder investigar cuáles bacterias serían presuntamente capaces de liberar el ADN al medio y éste ser aceptado por otras. Esto ayudaría a conocer si el ADNex está mayormente lineal o plasmídico, o si está fragmentado y de qué tamaños es.

Enfocándonos en la transformación natural de *Acinetobacter baumannii*, hay mucho por investigar acerca de este mecanismo de la bacteria. Se realizó la transformación mediante distintos tipos de métodos en esta tesis (datos no mostrados) para evaluar la manera más fácil de aceptar ADN, entre estos están la transformación líquida, semisólida y en filtro (*puddle*). Son pocos los trabajos que hablan sobre el mecanismo exacto en estos tres tipos de transformación y de frecuencias, pero en estos se encontró que la semisólida arrojaba los mejores resultados con el control y muestras positivas obtenidas por PCR. Sería interesante profundizar acerca de qué es lo que facilita la transformación de la bacteria, además de que presumiblemente las muestras presentaban ADN lineal y con qué probabilidad este pudo haber generado cambios en el genoma de *A. baumannii* que no son visibles en un crecimiento en agar con antibiótico (análisis por secuenciación).

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Barton Behravesh, C., Jones, T. F., Vugia, D. J., Long, C., Marcus, R., Smith, K., Thomas, S., Zansky, S., Fullerton, K. E., Henao, O. L., & Scallan, E. (2011). Deaths Associated With Bacterial Pathogens Transmitted Commonly Through Food: Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 1996–2005. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(2), 263–267. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir263>
- Barza, M. (2002). Potential Mechanisms of Increased Disease in Humans from Antimicrobial Resistance in Food Animals. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 34, Issue 3). [https://academic.oup.com/cid/article-abstract/34/Supplement\\_3/S123/292856](https://academic.oup.com/cid/article-abstract/34/Supplement_3/S123/292856)
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., & Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385–2397. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x>
- Bhunia, A. K. (2008). *Foodborne Microbial Pathogens. Mechanisms and Pathogenesis*. (D. Heldma (ed.); 2nd editio). Springer-Verlag. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1>
- Blau, K., Bettermann, A., Jechalke, S., Fornefeld, E., Vanrobaeys, Y., Stalder, T., Top, E. M., & Smalla, K. (2018). The Transferable Resistome of Produce. *MBio*, 9(6), 1–43. <https://doi.org/10.1128/mBio.01300-18>
- Blokesch, M. (2016). Natural competence for transformation. *Current Biology*, 26(21), R1126–R1130. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.058>
- Böckelmann, U., Dörries, H.-H., Ayuso-Gabella, M. N., Salgot de Marçay, M., Tandoi, V., Levantesi, C., Masciopinto, C., Van Houtte, E., Szewzyk, U., Wintgens, T., & Grohmann, E. (2009). Quantitative PCR monitoring of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in three European artificial groundwater recharge systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 154–163. <https://doi.org/10.1128/AEM.01649-08>

- Bougnom, B. P., Thiele-Bruhn, S., Ricci, V., Zongo, C., & Piddock, L. J. V. (2019). Raw wastewater irrigation for urban agriculture in Africa increases the diversity of transferable antibiotic resistance genes in soil, including those encoding ESBLs. *BioRxiv*, 2019(615922), 1–13. <https://doi.org/10.1101/615922>
- Bowen, A., Fry, A., Richards, G., & Beuchat, L. (2006). Infections associated with cantaloupe consumption: a public health concern. *Epidemiology and Infection*, 134(4), 675–685. <https://doi.org/10.1017/S0950268805005480>
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., & Muniesa, M. (2015). Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid*, 79, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.01.001>
- Cadena, M., Durso, L. M., Miller, D. N., Waldrip, H. M., Castleberry, B. L., Drijber, R. A., & Wortmann, C. (2018). Tetracycline and Sulfonamide Antibiotic Resistance Genes in Soils From Nebraska Organic Farming Operations. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01283>
- Chabou, S., Leangapichart, T., Okdah, L., Le Page, S., Hadjadj, L., & Rolain, J.-M. (2016). Real-time quantitative PCR assay with Taqman(®) probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance. *New Microbes and New Infections*, 13, 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.06.017>
- Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., & Hanage, W. P. (2015). Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evolutionary Applications*, 8(3), 240–247. <https://doi.org/10.1111/eva.12185>
- Corinaldesi, C., Tangherlini, M., Manea, E., & Dell’Anno, A. (2018). Extracellular DNA as a genetic recorder of microbial diversity in benthic deep-sea ecosystems. *Scientific Reports*, 8(1), 1839. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20302-7>
- Domingues, S., Harms, K., Fricke, W. F., Johnsen, P. J., da Silva, G. J., & Nielsen, K. M. (2012). Natural Transformation Facilitates Transfer of Transposons, Integrins and Gene Cassettes between Bacterial Species. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002837. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002837>

- Domingues, S., Ros, N., C, Â., Neto, D., Nielsen, K. M., & Silva, G. J. Da. (2019). Competence for Natural Transformation Is Common among Clinical Strains of Resistant. *Microorganisms*, 7(2), 30–37. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020030>
- Dong, P., Wang, H., Fang, T., Wang, Y., & Ye, Q. (2019). Assessment of extracellular antibiotic resistance genes (eARGs) in typical environmental samples and the transforming ability of eARG. *Environment International*, 125, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.050>
- Flint, J. A., Van Duynhoven, Y. T., Angulo, F. J., DeLong, S. M., Braun, P., Kirk, M., Scallan, E., Fitzgerald, M., Adak, G. K., Sockett, P., Ellis, A., Hall, G., Gargouri, N., Walke, H., & Braam, P. (2005). Estimating the Burden of Acute Gastroenteritis, Foodborne Disease, and Pathogens Commonly Transmitted by Food: An International Review. *Clinical Infectious Diseases*, 41(5), 698–704. <https://doi.org/10.1086/432064>
- Founou, L. L., Founou, R. C., & Essack, S. Y. (2016). Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>
- Garrec, H., Drieux-Rouzet, L., Golmard, J.-L., Jarlier, V., & Robert, J. (2011). Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum beta-lactamase production by Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 1048–1057. <https://doi.org/10.1128/JCM.02130-10>
- Gorni, C., Allemand, D., Rossi, D., & Mariani, P. (2015). Microbiome profiling in fresh-cut products. *Trends in Food Science and Technology*, 46(2), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.013>
- Hasegawa, H., Naganuma, K., Nakagawa, Y., & Matsuyama, T. (2003). Membrane filter (pore size, 0.22–0.45 µm; thickness, 150 µm) passing-through activity of *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species with indigenous infiltration ability. *FEMS Microbiology Letters*, 223(1), 41–46. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00327-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00327-6)
- Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. J., & Piddock, L. J. V. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of

- antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 176–187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
- Hu, Y., He, L., Tao, X., Meng, F., & Zhang, J. (2019). High DNA Uptake Capacity of International Clone II *Acinetobacter baumannii* Detected by a Novel Planktonic Natural Transformation Assay. *Frontiers in Microbiology*, 10(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02165>
- Ibáñez de Aldecoa, A. L., Zafra, O., & González-Pastor, J. E. (2017). Mechanisms and Regulation of Extracellular DNA Release and Its Biological Roles in Microbial Communities. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1390. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01390>
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., & Claverys, J. P. (2014). Bacterial transformation: Distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology*, 12(3), 181–196. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>
- Kelly, B. G., Vespermann, A., & Bolton, D. J. (2009). Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 969–977. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2008.02.007>
- La, M. Van, Jureen, R., Lin, R. T. P., & Teob, J. W. P. (2014). Unusual detection of an acinetobacter class d carbapenemase gene, blaOXA-23, in a clinical escherichia coli isolate. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(10), 3822–3823. <https://doi.org/10.1128/JCM.01566-14>
- Lake, I. R., & Barker, G. C. (2018). Climate Change, Foodborne Pathogens and Illness in Higher-Income Countries. *Current Environmental Health Reports*, 5, 187–196. <https://doi.org/10.1007/s40572-018-0189-9>
- Leff, J. W., & Fierer, N. (2013). Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059310>
- Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 34–44.

<https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>

- Leski, T. A., Bangura, U., Jimmy, D. H., Ansumana, R., Lizewski, S. E., Li, R. W., Stenger, D. A., Taitt, C. R., & Vora, G. J. (2013). Identification of blaOXA-51-like, blaOXA-58, bla DIM-1, and blaVIM carbapenemase genes in hospital Enterobacteriaceae isolates from Sierra Leone. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2435–2438. <https://doi.org/10.1128/JCM.00832-13>
- Levy-Booth, D. J., Campbell, R. G., Gulden, R. H., Hart, M. M., Powell, J. R., Klironomos, J. N., Pauls, K. P., Swanton, C. J., Trevors, J. T., & Dunfield, K. E. (2007). Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(12), 2977–2991. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2007.06.020>
- Lin, L., Yuan, K., Liang, X., Chen, X., Zhao, Z., Yang, Y., Zou, S., Luan, T., & Chen, B. (2015). Occurrences and distribution of sulfonamide and tetracycline resistance genes in the Yangtze River Estuary and nearby coastal area. *Marine Pollution Bulletin*, 100(1), 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.08.036>
- Marti, R., Scott, A., Tien, Y.-C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., & Topp, E. (2013). Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5701–5709. <https://doi.org/10.1128/AEM.01682-13>
- Mavrici, D., Yambao, J. C., Lee, B. G., Quiñones, B., & He, X. (2017). Screening for the presence of mcr-1/mcr-2 genes in Shiga toxin-producing Escherichia coli recovered from a major produce-production region in California. *PLoS ONE*, 12(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187827>
- McKinney, C. W., Dungan, R. S., Moore, A., & Leytem, A. B. (2018). Occurrence and abundance of antibiotic resistance genes in agricultural soil receiving dairy manure. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(3), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy010>
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., & Jones, A. L. (2002). Antibiotic Use in Plant Agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 443–465. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927>



- Mell, J. C., & Redfield, R. J. (2014). Natural Competence and the Evolution of DNA Uptake Specificity COMPETENCE. *Journal of Bacteriology*, 196(8), 1471–1483. <https://doi.org/10.1128/JB.01293-13>
- Ndi, O. L., & Barton, M. D. (2011). Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *Journal of Fish Diseases*, 34(8), 589–599. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01272.x>
- Nielsen, K. M., Johnsen, P. J., Bensasson, D., & Daffonchio, D. (2007). Thematic Issue on Horizontal Gene Transfer Review Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ. Biosafety Res*, 6, 37–53. <https://doi.org/10.1051/ebr:2007031>
- Nolan, L. M., Turnbull, L., Katrib, M., Osvath, S. R., Losa, D., & Whitchurch, C. B. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* is capable of natural transformation in biofilms. *BioRxiv*, 859553. <https://doi.org/10.1101/859553>
- Oh, S. S., Song, J., Kim, J., & Shin, J. (2020). Increasing prevalence of multidrug-resistant mcr-1-positive *Escherichia coli* isolates from fresh vegetables and healthy food animals in South Korea. *International Journal of Infectious Diseases*, 92, 53–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.12.025>
- Ohore, O. E., Gyawu Addo, F., Zhang, S., Han, N., & Anim-Larbi, K. (2018). *Distribution and relationship between antimicrobial resistance genes and heavy metals in surface sediments of Taihu Lake, China*. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.09.004>
- Onyango, L. A., Dunstan, R. H., & Roberts, T. K. (2010). Filterability of staphylococcal species through membrane filters following application of stressors. *BMC Research Notes*, 3, 152. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-152>
- Overballe-Petersen, S., Harms, K., Orlando, L. A. A., Moreno Mayar, J. V., Rasmussen, S., Dahl, T. W., Rosing, M. T., Poole, A. M., Sicheritz-Ponten, T., Brunak, S., Inselmann, S., De Vries, J., Wackernagel, W., Pybus, O. G., Nielsen, R., Johnsen, P. J., Nielsen, K. M., & Willerslev, E. (2013). Bacterial natural transformation by highly fragmented and damaged DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(49), 19860–19865. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315278110>

- Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M. T., Guerri, G., & Nannipieri, P. (2009). Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45(3), 219–235. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>
- Rahube, T. O., Marti, R., Scott, A., Tien, Y.-C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., Duenk, P., Lapen, D. R., & Topp, E. (2014). Impact of Fertilizing with Raw or Anaerobically Digested Sewage Sludge on the Abundance of Antibiotic-Resistant Coliforms, Antibiotic Resistance Genes, and Pathogenic Bacteria in Soil and on Vegetables at Harvest. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(22), 6898–6907. <https://doi.org/10.1128/AEM.02389-14>
- Ramírez, G. A., Jørgensen, S. L., Zhao, R., & D'Hondt, S. (2018). Minimal Influence of Extracellular DNA on Molecular Surveys of Marine Sedimentary Communities. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2969. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02969>
- Ramirez, M. S., Don, M., Merkier, A. K., Bistué, A. J. S., Zorreguieta, A., Centrón, D., & Tolmasky, M. E. (2010). Naturally competent acinetobacter baumannii clinical isolate as a convenient model for genetic studies. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1488–1490. <https://doi.org/10.1128/JCM.01264-09>
- Raphael, E., Wong, L. K., & Riley, L. W. (2011). Extended-spectrum beta-lactamase gene sequences in Gram-negative saprophytes on retail organic and nonorganic spinach. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1601–1607. <https://doi.org/10.1128/AEM.02506-10>
- Richardson, L. A. (2017). Understanding and overcoming antibiotic resistance. *PLOS Biology*, 15(8), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003775>
- Roberts, A. P., & Kreth, J. (2014). The impact of horizontal gene transfer on the adaptive ability of the human oral microbiome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 124. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00124>
- Rodríguez, C., Lang, L., Wang, A., Altendorf, K., García, F., & Lipski, A. (2006). Lettuce for human consumption collected in Costa Rica contains complex communities of culturable oxytetracycline- and gentamicin-resistant bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5870–5876. <https://doi.org/10.1128/AEM.00963->

- Schmidt, G. V., Møllerup, A., Christiansen, L. E., Ståhl, M., Olsen, J. E., & Angen, Ø. (2015). Sampling and Pooling Methods for Capturing Herd Level Antibiotic Resistance in Swine Feces using qPCR and CFU Approaches. *PloS One*, 10(6), e0131672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131672>
- Sun, D. (2018). Pull in and Push Out: Mechanisms of Horizontal Gene Transfer in Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2154. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02154>
- Talebi, M., Sadeghi, J., Rahimi, F., & Pourshafie, M. R. (2015). Isolation and Biochemical Fingerprinting of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* From Meat, Chicken and Cheese. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(4), e15815. [https://doi.org/10.5812/jjm.8\(4\)2015.15815](https://doi.org/10.5812/jjm.8(4)2015.15815)
- Thanner, S., Drissner, D., & Walsh, F. (2016). Antimicrobial Resistance in Agriculture. *MBio*, 7(2), 1–7. <https://doi.org/10.1128/mBio.02227-15>
- Torti, A., Lever, M. A., & Jørgensen, B. B. (2015). Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments. *Marine Genomics*, 24, 185–196. <https://doi.org/10.1016/J.MARGEN.2015.08.007>
- Traglia, German M., Place, K., Dotto, C., Fernandez, J. S., Montaña, S., Bahiense, C. dos S., Soler-Bistue, A., Iriarte, A., Perez, F., Tolmasky, M. E., Bonomo, R. A., Melano, R. G., & Ramírez, M. S. (2019). Interspecies DNA acquisition by a naturally competent *Acinetobacter baumannii* strain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(4), 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.12.013>
- Traglia, German Matias, Quinn, B., Schramm, S. T. J., Soler-Bistue, A., & Ramirez, M. S. (2016). Serum albumin and Ca<sup>2+</sup> are natural competence inducers in the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(8), 4920–4929. <https://doi.org/10.1128/AAC.00529-16>
- Utnes, A. L. G., Sørum, V., Hülter, N., Primicerio, R., Hegstad, J., Kloos, J., Nielsen, K. M., & Johnsen, P. J. (2015). Growth phase-specific evolutionary benefits of natural transformation in *Acinetobacter baylyi*. *ISME Journal*, 9(10), 2221–2231.

<https://doi.org/10.1038/ismej.2015.35>

- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277–283. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>
- Verraes, C., Van Boxtael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, M.-A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J., & Herman, L. (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(7), 2643–2669. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>
- Vlassov, V. V., Laktionov, P. P., & Rykova, E. Y. (2007). Extracellular nucleic acids. *BioEssays*, 29(7), 654–667. <https://doi.org/10.1002/bies.20604>
- von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M., & Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
- Vorkapic, D., Pressler, K., & Schild, S. (2016). Multifaceted roles of extracellular DNA in bacterial physiology. *Current Genetics*, 62(1), 71–79. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0514-x>
- Wilharm, G., Piesker, J., Laue, M., & Skiebe, E. (2013). DNA Uptake by the nosocomial pathogen *acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *Journal of Bacteriology*, 195(18), 4146–4153. <https://doi.org/10.1128/JB.00754-13>
- Zhang, Y., Niu, Z., Zhang, Y., & Zhang, K. (2018). Occurrence of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in coastal areas of Bohai Bay (China) and the factors affecting them. *Environmental Pollution*, 236, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.033>

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

**Andrea Huerta Escobedo**

Candidata para el Grado de

**Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología**

Tesis:

**PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN EL ADN  
EXTRACELULAR OBTENIDO DE LA CADENA DE PRODUCCIÓN DEL  
MELÓN Y SU CAPACIDAD DE INSERCIÓN EN BACTERIAS**

**Campo de estudio:** Microbiología de alimentos

**Datos personales:** Nacida en Saltillo, Coahuila, México, el 29 de septiembre de 1996, hija de Ramón Huerta Medina y Sonia Ruth Escobedo López.

**Educación:** Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Biotecnología Genómica en 2018.

**Experiencia Profesional:**

Servicio Social realizado de Junio-Diciembre 2017 en la Unidad de Infectología Molecular (UIMO) L3 del Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la UANL.

Becaria de laboratorio de la materia Técnicas de Manipulación de Ácidos Nucleicos durante Enero-Julio 2018. Encargada de la realización de las prácticas de laboratorio de la materia.

Tesis de Licenciatura realizada en UIMO del LIV de la UANL durante Junio 2017-Julio 2018, dirigida por el Dr. José Manuel Vázquez Guillén como Director de Tesis y el Dr. Gerardo del Carmen Palacios Saucedo como Director Externo.